

Série A, N° 4117
N° d'Ordre : 4968

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

GÉRARD BUTTIN

1^{re} THÈSE. " Mécanismes régulateurs dans la biosynthèse des enzymes
du métabolisme du galactose chez *Escherichia Coli K 12* ".

2^e THÈSE. - Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 28 Juin 1963 devant la Commission d'examen.

MM. L'HÉRITIER

Président

LEDERER

MONOD

} *Examineurs*

Série A, N° 4117
N° d'Ordre : 4968

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

GÉRARD BUTTIN

1^{re} THÈSE. " Mécanismes régulateurs dans la biosynthèse des enzymes
du métabolisme du galactose chez *Escherichia Coli K 12* ".

2^e THÈSE. - Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 28 Juin 1963 devant la Commission d'examen.

MM. L'HÉRITIER

Président

LEDERER

MONOD

} *Examineurs*



Faculté des Sciences de l'Université de Paris

Doyen : M. ZAMANSKY

Professeurs :

G. JULIA	T Anal. sup. et Alg. sup.	SCHARTZ	T Calcul diff. et intégral.
PRENANT	T Anat. et histol. comp.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
GRASSÉ	T Evol. des êtres organ.	MALAVARD	T Aviation (Techn. aér.).
PRÉVOST	T Chimie organique.	ÉRELOT	T Calcul diff. et intégral.
WYART	T Minéralo. et Cristallog.	NORMANT	T Chimie organique.
TEISSIER	T Zoologie.	BENARD	T Chimie minérale.
MANGENOT	T Biologie vég. (Orsay).	BUVAT	T Botanique (E.N.S.).
AUGER	T Phys. quant. et relat.	DUGUE	T Statist. mathématique.
MONNIER	T Physiologie générale.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
PIVETEAU	T Paléontologie.	ULRICH	T Physiologie végétale.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	MARÉCHAL	T Optique théor. et appl.
CARTAN	T Mathémat. (E.N.S.).	KIRRMANN	T Théories chimiques.
LAFFITTE	T Chimie générale.	CHADEFAUD	T Botanique.
FAVARD	T Géométrie supérieure.	Mlle LE BRETON	T Physiol. de la nutrition.
COULOMB	T Physique du Globe.	SALEM	T Mathématiques génér.
Mlle COUSIN	T Biologie anim. (SPCN)	LELONG	T Appliq. de l'analyse à la Géométrie.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	DEVILLERS	T Anatomie et histologie comparées.
DRACH	T Zoologie.	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
KASTLER	T Physique (E.N.S.).	FRANCON	T Physique (SPCN).
EPHRUSSI	T Génétique.	GLANGEAUD	T Géographie phys. et Géologie dyn. amér.
RIVIÈRE	T Géologie SPCN et Séd.	GODEMENT	T Mathématiques (MPC)
GAUTHERET	T Biologie vég. (P.C.B.).	PISOT	T Techniq. mathématique de la Physique.
LUCAS R.	T Recherches physiques.	ROCH	T Géologie.
THOMAS A.	T Biologie cellulaire.	SCHATZMAN	T Astrophysique.
ARNULF	T Optique appliquée.	TERMIER	T Paléontolog. stratigr.
MORAND	T Physique Enseignement	ZAMANSKY	T Mathématiques génér.
SOLEILLET	T Physique (P.C.B.).	LENNUIER	T Physique (M.G.P.).
PORTIER	T Mécanique exp. fluide.	RIZET	T Génétique.
DANJON	T Astronomie.	ROUTHIER	T Géologie appliquée.
PETIT	T Biologie maritime.	M ^{me} TONNELAT	T Physique théorique.
QUENÉY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	DIXMIER	T Mathématiques (MPC).
GALLIEN	T Embryologie.	SOUCHAY	T Chimie générale.
EICHHORN	T Botanique.	AIGRAIN	T Electrotechn. générale.
DE CUGNAC	T Biologie vég. (SPCN).	BRUSSET	T Chimie systématique.
Mlle CAUCHOIS	T Chimie, Physique.	M. LÉVY	T Physique théor. des Htes énergies (Orsay)
THELLIER	T Physique du Globe.	M ^{me} CHAIX	T Chimie biologique.
L'HÉRITIER	T Biologie gén. (Orsay).	M ^{me} HUREL-PY	T Biologie vég. t. (PCB).
GRIVET	T Radioélectr. (Orsay).	PIAUX	T Chimie (M.P.C.).
PONCIN	T Mécanique générale.	BRUN	T Mécanique théor. des Fluides.
DUBREIL	T Arithm. et Théorie des nombres.	LEDERER	T Chimie biologique.
QUELET	T Chimie organique.	M ^{me} DUBREIL	T Mathématiques (Ag.).
CAGNIARD	T Géophysique appliquée	M ^{me} LELONG	T Mathématique II (ENS).
CHAMPETIER	T Chimie macromolécul.	BELLAIR	T Géologie. (S.P.C.N.).
CUVILLIER	T Micropaléontologie.	COTTE	T Physique électricité.
JUNG	T Pétrographie.	DUBOIS J. E.	T Chimie organique.
TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.	LAMOTTE	T Zoologie (E.N.S.).
WIEMANN	T Chimie org. et struct.	MICHEL A.	T Chimie minér. (Orsay)
JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).	OLMER	T Énergie générale.
VASSY	T Phys. de l'atmosphère.	ROUAULT	T Electrocité (Orsay).
DESTOUCHES	T Théories physiques.	GAUTHIER	T Mécanique appliquée.
AMIEL	T Chimie générale.	BARCHEWITZ	T Chimie physique.
HOCART	T Minéralo. et Cristallog.	BROSSEL	T Physique atonique.
J.P. MATHIEU	T Physique optique.	BUSER	T Physiologie com. aérée.
COUTEAUX	T Biologie anim. (PCB).	CAMUS	T Physiol. végét. (BMPV)
MAY	T Zoologie (Orsay).	CASTAING	T Phys. II Therm. (Ors.).
CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie.	CURIEN	T Minéralo. et Cristallog.
FELDMANN	T Biologie v.g. marine.	MOYSE	T Physiol. végét. (Orsay)
GUINIER	T Phys. des Solides (Ors.).	NOIROT	T Evolution d. êtres org.
JOST	T Physiologie comparée.	PANNETIER	T Chimie générale.
FORTET	T Calcul des Probabilités et Physique mathém.	POSSOMPES	T Zoologie.

PULLMANN	T Chimie quantique.	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appliq. à la Chimie théor. et à la Physique nucléaire.
TEILLAC	T Physique nucl. et Radioactivité.	Mlle FOURCROY	Biologie végév. (SPCN)
TONNELAT	T Biologie physico-chim.	M ^{me} CHOQUET-BRUHAT	T Mécan. analytique et mécanique céleste.
VILLE	T Econométrie.	Mlle VEIL	Physiologie générale.
WILLEMART	T Chimie (P.C.B.).	LWOFF	T Microbiologie.
DODE	T Chimie (Orsay).	SIESTRUNK	T Mécan. phys. et expér.
FREYMAN	T Recherches physiques.	LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires.
GUINOCHE	T Biol. vég. SPCN (Ors.)	BROCHARD	T Physique PCB (Orsay).
ROLLET	T Chimie minérale.	CABANNES	T Mécanique générale.
Mlle JOSIEN	T Chimie (S.P.C.N.).	LESIEUR	T Mathémat. I (Orsay).
CHEVALLEY	T Géométrie algèbre. et théorie des Groupes.	MAZET	T Mécanique gen.(Orsay)
ARNOULT	T Electronique (Orsay).	CAIRE	T Géographie phys. et Géolog. dynamique.
CHAPELLE	T Physique (Orsay).	COMOLET	T Mécanique des fluides.
DELANGE	T Mathématiq. I (Ors.)	CORABEUF	T Physiol. anim. (Orsay)
DENY	T Mathémat. gén. (Ors.)	DELLOUE	T Phys.q. de l'exosphère.
GERMAIN	T Mécanique théor. des Fluides.	GORENFLOT	T Botanique II (Orsay).
LUCAS G.	T Géologie.	HOULLON	T Biologie an m. (P.C.B.)
ALLARD	T Chimie physique.	JULLIEN J.	T Chimie SPCN (Orsay).
BERTHELOT	T Phys. des part c. fond.	MALGRANGE	T Technique math. de la Physique (Orsay).
BRICARD	T Météor. et Phys. de l'atmosphère.	OLIVIER	T Antropologie.
M ^{me} ALBE-FESSARD ..	T Psychophysologie.	NOZERAN	T Botanique II (Orsay).
FRIEDEL	T Phys. des Solides (Ors.)	BLANC-LAPIERRE	T Physique ENS (Orsay)
M. JULIA	T Etudes des Moléculaires natur. compexes.	CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay).
LENDER	T Biol. anim. SPCN (Ors.)	KAHANE	T Mathématiques (Ors.).
MAGAT	T Physico chimie des radio-éléments.	SAMUEL	T Mathémat. ENS féminin.
Mlle QUINTIN	T Electrochimie.	KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay).
MONOD	T Chimie du métabolisme.	THIRY	T Mécanique céleste.
BENOIT	T Physiol. anim. (Orsay)	ABELES	T Physique (SP.CN).
DE POSSEL	T Analyse numérique.	AMAT	T Physique (P.C.B.).
CHARLOT	T Chimie analytique.	AUBOIN	T Géologie.
LEMÉE	T Phys. vég. BMPV(Ors.)	M ^{me} BENOIT-GUEUTAL	T Physique nucléaire et Radioactivité.
GUÉRIN	T Chimie M.P.C. (Orsay)	BOUGIS	T Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)
CHATELET M.	T Chimie P.C.B.	BRUHAT	T Mathématiques MPC.
JEAN	T Physique nucl. (Orsay)	BRUNN	T Géologue his or.(Orsay)
MATTLER	T Physique S.C.N.	CHABBAL	T Physique MGP (Orsay)
BERGERARD	T Zoologie (Orsay).	DEHEUVELS	T Math. Prop. (Orsay).
BERTIN	T Electronique (Orsay).	D'ESPAGNAT	T Physiq. théor. (Orsay)
BOUSSIÈRES	T Chimie des radioéléments. (Orsay).	FURON	T Géologie SPCN.
M ^{me} COUTURE	T Thermodynamique et Mécanique physique.	M ^{me} GANS	T Génétique.
ELLENBERGER	T Géologie des grandes régions du Globe.	GENÈVES	T Biologie vég. (P.C.B.).
FRANC	T Biologie anim. (PCB).	GUILBERT	T Physiq. (CUS. Orleans).
SCHNELL	T Botan. tropic. (Orsay).	HUPE	T Pétrographie.
STOLKOWSKI	T Physiologie végétale.	HOLLANDE	T Biologie générale.
ARCHER	T Chimie biol. (Orsay).	LIONS	T Analyse numérique.
BAUDOUIN	T Biologie anim. (PCB).	MAITTE	T Chimie (P.C.B.).
BEAUMONT	T Biolog. anim. (SPCN).	MEYER	T Physique prop deut.
BLAMONT	T Géophysique ionosph.	NICOLAS	T Géologie appliquée.
POURREAU	T Botanique.	PANIGEL	T Biologie générale.
CURIE D.	T Physique (M.G.P.).	RAVIER	T Pétrographie.
DURAND-DELGA	T Géologie.	ROSEAU	T Mécanique théorique des Fluides.
FRÉON	T Chimie organ. (Orsay).	ROUBINE	T Electronique.
HELLER	T Physiologie végétale.	SILBER	T Chimie (P.C.B.).
TORTRAT	T Calcul d. Probabilités.	UEBERSFELD	T Electronique.
CAILLEUX	T Géologie (S.P.C.N.).	YVON	T Théories phys.ques.
MAGNAN	T Physique (S.P.C.N.).		

Le Secrétaire Général,
R. POUILLAIN

Mécanismes Régulateurs dans la Biosynthèse des Enzymes du Métabolisme du Galactose chez *Escherichia coli* K12

I. La Biosynthèse Induite de la Galactokinase et l'Induction Simultanée de la Séquence Enzymatique

G. BUTTIN

Service de Biochimie cellulaire, Institut Pasteur, Paris, France

(Received 10 April 1963)

Various aspects of the kinetics of induction of galactokinase have been studied in *E. coli* K12. Enzyme biosynthesis does not continue after exhaustion of the inducer; galactokinase can be induced under conditions of complete "gratuity" by 6-deoxygalactose (D-fucose); induction is specifically inhibited by different β -D-thiogalactosides.

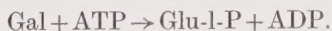
Uridyltransferase and epimerase, which catalyse the subsequent steps of the metabolic pathway, are not induced sequentially. They can be induced by D-fucose which is not a substrate of galactokinase. The interruption of the metabolic sequence by a specific genetic block at any step does not stop the induction of the remaining functionally active enzymes. Inducers and inhibitors of induction of these enzymes both control the rate of synthesis of galactose-permease.

A class of mutants not previously described, which includes mutants lacking galactose-permease, has been demonstrated. Only high concentrations of galactose and fucose will induce galactokinase in these mutants. They can be grown on agar supplemented by sufficient concentrations of galactose.

1. Introduction

Les enzymes inductibles qui catalysent les étapes spécifiques de la conversion du galactose chez *E. coli* K12 constituent, à certains égards, un matériel expérimental exceptionnellement favorable pour l'étude des constituants cellulaires impliqués dans la biosynthèse de protéines spécifiques. Les réactions biochimiques qui gouvernent ces enzymes sont bien définies: l'utilisation du galactose suit exclusivement chez cette bactérie la voie métabolique découverte par Leloir chez les levures (Leloir, 1951; Kalckar, Kurahashi & Jordan, 1959); elle comprend trois réactions qui supposent l'intervention de trois enzymes:

Galactokinase: $\text{ATP} + \text{Gal} \rightarrow \text{ADP} + \text{Gal-1-P}$. Galactose-1-phosphate uridyltransférase (transférase): $\text{Gal-1-P} + \text{UDP Glu} \rightleftharpoons \text{UDP Gal} + \text{Glu-1-P}$. Uridine diphosphogalactose-4-épimérase (épimérase): $\text{UDP Gal} \rightleftharpoons \text{UDP Glu}$, réalisant la transformation globale:



L'individualité des trois protéines enzymatiques a été établie par la purification de chacune d'elles (Kurahashi & Sugimura, 1960; Sherman, 1962; Fukasawa, Jokura & Kurahashi, en préparation). Les déterminants génétiques qui renferment l'information propre à chaque activité enzymatique sont groupés (Lederberg, 1960);

† Abréviations: Gal = D-galactose; Gal-1-P = α -D-galactose-1-phosphate; Glu-1-P = α -D-glucose-1-phosphate; UDP Glu = uridinediphosphoglucose; UDP Gal = uridinediphosphogalactose; DPN = diphosphopyridine nucléotide; TMG = thiométhyl- β -D-galactoside.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

l'étude de semblables associations de gènes, dont l'intégrité conditionne l'activité de protéines fonctionnellement liées, présente un intérêt particulier en raison des indications qu'elle est susceptible de fournir sur les modalités de la transcription de l'information génétique (Jacob & Monod, 1961a). Cette séquence génétique peut être transférée aisément de cellule à cellule grâce à l'intervention d'un système spécifique de transduction (Morse, Lederberg & Lederberg, 1956); une telle propriété permet d'observer l'expression d'un gène au sein d'un cytoplasme étranger, ainsi que d'étudier dans quelle mesure l'expression de déterminants bactériens peut être affectée par l'association de ceux-ci avec le génome du bactériophage transducteur.

Ces propriétés particulières ont été mises à profit au cours de cette étude. Le modèle récemment proposé par Jacob & Monod (1961b) pour les biosynthèses d'enzymes conduit à envisager les processus de régulation sous la forme d'interactions entre *répresseurs* cellulaires spécifiques et *opérateurs de régulation* qui gouvernent la transcription de segments de génome (*opérons*) pouvant comprendre plusieurs cistrons. Les résultats rapportés dans la seconde partie de cette étude montrent que l'association topologique des trois déterminants enzymatiques correspond effectivement à l'existence d'une *unité de transcription*; leur expression est simultanément déreprimée soit par des mutations qui altèrent la structure d'un opérateur étroitement lié aux déterminants de structure, soit par les mutations d'un gène-indépendant de l'*opéron galactose* qui élabore vraisemblablement le *répresseur* spécifique de ce système métabolique. Dans les différents types d'associations structurales reconnues entre l'*opéron galactose* et le génome du prophage λ —"juxtaposition" (bactéries lyso-gènes) ou intégration (particules défectives transductrices)—la sensibilité de l'opérateur au répresseur spécifique est conservée; mais la repression cesse d'être effective lorsqu'on provoque le développement végétatif du prophage (Buttin, Jacob & Monod, 1960; Yarmolinsky & Wiesmayer, 1960), ainsi que pendant le cycle de développement de particules transductrices infectieuses dans une cellule sensible. Les interprétations possibles de ces observations seront discutées dans la dernière partie de cette étude.

Les observations rapportées ici concernent plus particulièrement le mode d'action des inducteurs: nous établirons que l'induction des trois enzymes ne résulte pas d'un processus séquentiel; elle peut être provoquée, dans des conditions de complète *gratuité*, par un inducteur qui ne paraît subir aucune transformation métabolique, situation qui s'interprète aisément si l'action de l'inducteur se situe au niveau d'un unique represseur. Il est apparu au cours de cette étude que des concentrations d'inducteur, saturantes pour les souches sauvages, pouvaient être inopérantes sur d'autres clones. L'analyse de ce phénomène a mis en évidence l'existence de mutants dépourvus du système spécifique de concentration du galactose ou *galactose-perméase*. Nous montrerons que ce système, dont l'existence avait été établie par les travaux de Horecker, Thomas & Monod (1960), est inductible; le déterminisme génétique de la régulation de sa biosynthèse sera discuté simultanément avec celui des biosynthèses des trois autres enzymes.

2. Matériel et Méthodes

Souches bactériennes

Les clones d'*E. coli* K12 utilisés sont la souche à haute fréquence de recombinaison Hfr H (Hayes, 1953) et un mutant streptomycine-résistant (C600Sr) de la souche de

caractère sexuel F⁻, C600Sr (Appleyard, 1954) ainsi que certains mutants d'utilisation du lactose (30SO, 3300) isolés à partir de l'Hfr H par MM. Monod & Jacob. La souche 20SO est un recombinant issu du croisement entre la souche 30SO et la souche F⁻ P678 (Jacob & Wollman, 1956). Les souches (affectées par des mutations au niveau des enzymes d'utilisation du galactose) PL2, 112-19 et 138-10 sont des mutants d'Hfr H; B34-5 et B34-10 des mutants de C600Sr (Buttin, 1963).

Cultures en milieu liquide

Les cultures ont été faites en milieu minéral synthétique 63 de composition: KH₂PO₄, 13.6 g; MgSO₄.7H₂O, 0.2 g; (NH₄)₂SO₄, 2 g; FeSO₄.7H₂O, 0.005 g; eau bidistillée q.s.p. 1000. Ajusté à pH 7.2 par KOH. La source énergétique carbonée était ajoutée à la concentration de 2 à 4 g/l.; les facteurs de croissance indispensables étaient incorporés en fonction des besoins spécifiques (thiamine: 0.5 à 5 µg/ml.; thréonine et leucine: 0.1 mg/ml.).

Les cultures étaient aérées par agitation dans un bain à 37°C. La croissance était suivie par néphélométrie et la masse bactérienne estimée par conversion des unités du photomètre, préalablement étalonné.

Produits chimiques

Sucres et dérivés: le D-galactose utilisé avait été deux fois recristallisé. Quelques expériences ont été faites avec du D-galactose de la qualité *glucose-free* de Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A. Le [¹⁴C]D-galactose uniformément marqué a été synthétisé au Laboratoire des Isotopes de l'Institut Pasteur. Le D-fucose provenait de Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, U.S.A. Certains lots étant contaminés par des quantités importantes de galactose, les expériences d'induction ont été faites en utilisant un échantillon de D-fucose dont la chromatographie en butanol-éthanol-eau révélée par le phtalate d'aniline avait montré qu'il contenait une quantité de sucres contaminants inférieurs à 1% du D-fucose. La D-galactosamine était un produit de Light and Co., Colnbrook, Middlesex, England; l'α-D-gala-L-mannoheptose et le L-galactose provenaient de General Biochemicals Inc., Chagrin Falls, Ohio, U.S.A., le L-arabinose (qualité C.P.) de Pfansthiehl, U.S.A. Les α- et β-fluoro-D-galactosides, 4-oxyméthyl D-galactose, 6-oxyméthyl D-galactose, le sel de sodium du β-thio-D-galactose étaient des dons du Pr. Stanek et du Dr. Czerny, Université Charles, Prague, Tchécoslovaquie. Les thiogalactosides utilisés ont été synthétisés au laboratoire selon les techniques décrites par Türk (1955) à partir de thiogalactose ou de tétracétobromogalactose. L'acide galacturonique avait été trois fois recristallisé au laboratoire. L'uridine disphosphogalactose a été synthétisé selon Wiesmayer & Jordan (1961). Un échantillon de ce produit était un don de H. Szulmajster, Laboratoire du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette.

Le galactose [¹⁴C]l-phosphate a été produit enzymatiquement de la façon suivante: du [¹⁴C]galactose et de l'ATP étaient incubés (en volume de 5 à 20 ml.) en présence d'une préparation partiellement purifiée de galactokinase (extraite d'une souche d'*E. coli* dépourvue de transférase et synthétisant constitutivement la galactokinase) dans des conditions essentiellement semblables à celles qui ont été adoptées pour le dosage de la galactokinase; des prélèvements permettaient de suivre le cours de la phosphorylation. Lorsque celle-ci atteignait un plateau, correspondant à la conversion de plus de 90% du [¹⁴C]galactose, la réaction était stoppée par chauffage à 100°C pendant 120 sec. Après centrifugation des protéines précipitées, le surnageant était débarrassé d'une partie du galactose libre, de l'ATP et de l'ADP, par un passage sur charbon actif. La concentration de galactose-l-phosphate était ajustée à la valeur voulue par addition de galactose [¹²C]l-phosphate (Sigma Chemical Company).

Divers

Ont été utilisés en outre: magnésium-titriplex; E. Merck, Darmstadt, Allemagne; uridinediphosphoglucosedeshydrogenase: Sigma Chemical Company; charbon actif: Norit A. Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey, U.S.A.; filtres *Millipore*: Millipore Filter Co., Bedford, Massachusetts, U.S.A.

Détermination des activités enzymatiques

Nous définirons comme unités d'activités enzymatiques (U) l'activité de chacune des enzymes qui convertit 1 μ mole de substrat spécifique (respectivement: galactose, galactose-1-phosphate et uridinediphosphogalactose) par heure dans les conditions de chaque dosage ci-dessous décrites.

(a) Dosage de la galactokinase

Extraction: la courbe exprimant le rendement de l'extraction par les vibrations soniques (oscillateur Raytheon 10 KC) en fonction du temps de traitement présente un maximum très peu aigu désignant comme maximale l'activité démasquée en 5 à 15 min. L'efficacité de diverses techniques d'extraction s'est révélée inférieure à celle du traitement sonique (extraction par broyage, par le butanol, le cyclohexanol). L'incubation des cellules 30 à 60 min à 37°C en présence de 0.05 de leur volume de toluène démasque presque aussi complètement l'enzyme. En raison de l'intérêt qu'elle offre pour le traitement simultané d'échantillons multiples, la toluénisation a été utilisée systématiquement au cours des expériences de cinétique. Quel que soit le mode d'extraction choisi, une fraction importante de l'activité est rapidement et irréversiblement perdue si l'on procède à l'extraction sans qu'un agent protecteur des groupements thiols soit présent (β -mercaptoéthanol ou glutathion). Même en présence de ces protecteurs, l'agitation prolongée des suspensions inactive partiellement l'enzyme. L'addition dès l'extraction d'un agent chélateur des métaux lourds (*magnesium-titriplex* 10^{-3} M) s'est révélée particulièrement efficace pour éviter l'inactivation de l'enzyme; cet effet a été observé par plusieurs autres auteurs (Horowitz, 1962; Sherman, 1962).

Dosage: la méthode isotopique utilisée est semblable à celle qu'ont décrite Horecker *et al.* (1960). Le galactose-1-phosphate produit par la réaction:



est précipité à l'état de sel de baryum dans l'éthanol à 80% et séparé du galactose par filtration; la radioactivité du précipité est mesurée. Dans la plupart des expériences, les tubes d'incubation (37°C) contiennent en un volume de 100 μ l.: 0.25 μ moles $[^{14}\text{C}]\text{galactose}$; 0.4 μ moles ATP, 0.33 μ moles MgCl_2 , 0.8 μ moles NaF et 8 μ moles tampon glycylglycine-NaOH, pH 7.5.

La réaction débute lors de l'addition de 150 μ l. d'extrait bactérien. Elle est arrêtée par addition de 9 volumes d'éthanol à 90% contenant 11 mg de bromure de baryum par ml. Le précipité qui se forme est filtré sur membranes *Millipore* type HA, lavé par 12 à 15 ml. d'éthanol à 80% et sa radioactivité est mesurée dans un compteur à fenêtre mince. Dans les conditions du dosage, en raison de la présence de magnésium dans le milieu 63 et de l'addition du *magnésium-titriplex*, la concentration totale en magnésium, indispensable à l'activation de l'enzyme, est d'environ 3 μ mole/ml.; il a été vérifié qu'une concentration plus élevée de cet ion n'accélère pas la réaction. Aux concentrations inférieures à 10^{-2} M, le fluorure de sodium ajouté systématiquement pour inhiber l'action des phosphatases n'inhibe pas de façon sensible l'activité de la galactokinase. Les ions potassium et ammonium du milieu de culture paraissent sans effet sur la vitesse de réaction, l'addition de l'un ou l'autre ion à la concentration 10^{-2} M à un mélange réactionnel qui ne le contient pas ne modifiant pas la vitesse de phosphorylation. Pendant le dosage, le β -mercaptoéthanol—ajouté aux suspensions dès le début de l'extraction—est présent à la concentration de 3×10^{-2} M. Dans ces conditions, la quantité de galactose phosphorylé est proportionnelle au temps d'incubation pendant plus de 90 min et à la quantité d'extrait bactérien jusqu'à 300 μ g au moins de bactéries par ml. de suspension.

Les déterminations sont reproductibles avec des écarts inférieurs à $\pm 5\%$. Les valeurs trouvées sont proportionnelles aux activités enzymatiques tant que la quantité de galactose phosphorylé ne dépasse pas 25% environ du galactose initialement présent. Aux faibles activités enzymatiques, la précision du dosage est réduite essentiellement par la rétention de galactose libre dans le microprécipité: environ 0.5% de la radioactivité totale. Les résultats exprimés ne sont pas corrigés pour la self-absorption du rayonnement, peu importante et pratiquement identique pour tous les échantillons.

(b) *Dosage de la transférase*

La vitesse initiale de conversion du [^{14}C]Gal-l-P en UDP- ^{14}C]Gal, en présence d'un excès d'UDP Glu, mesure l'activité de cette enzyme. Le matériel nucléotidique ainsi transformé est adsorbé sur charbon actif, séparé du [^{14}C]Gal-l-P par filtration et la radio-activité retenue sur le charbon est mesurée. Sauf mention particulière, l'enzyme a été extraite en soumettant les cellules aux vibrations d'un oscillateur sonique (oscillateur Mullard—4 traitements de 30 sec); le démasquage par le toluène est incomplet. La composition du mélange d'incubation utilisé pour le dosage est la suivante: 25 μl . soit 0.1 μM [^{14}C]Gal-l-P (solution stock à 4 $\mu\text{moles/ml}$.); 25 μl . UDP Glu (solution à 12 mg/ml. en tampon glycylglycine 0.5 M; pH 7.5). La réaction débute lors de l'addition de 40 μl . d'extrait bactérien contenant du β -mercaptoéthanol 5×10^{-2} M et du *magnesium-titriplex* 10^{-3} M. Après incubation à 37°C, la réaction est interrompue par addition de 100 μl . d'acide trichloracétique à 10%; 15 sec plus tard, 2 ml. de milieu 63 préalablement ajusté à pH 6 contenant en suspension 3 mg de charbon actif par ml. sont ajoutés à chaque tube. Les tubes sont conservés à 4°C pendant une nuit puis leur contenu est filtré sous vide sur des disques en fibre de verre (Whatman glass paper GF/B).

La conversion par l'épimérase d'UDP [^{14}C]Gal en UDP [^{14}C]Glu qui permettrait la réutilisation de composé comme substrat de la transférase, et se traduirait en définitive par une conversion d'UDP [^{14}C]Gal en [^{14}C]Glu-l-P ne déterminerait une perte sensible en matériel radioactif adsorbable sur charbon que si la réaction d'épimérisation se produisait dans le sens de la formation d'UDP Glu et si, de plus, l'UDP [^{14}C]Glu constituait une fraction suffisamment importante de l'UDP Glu total; dans les conditions adoptées pour le dosage, cette situation ne saurait être réalisée. La valeur relative des constantes d'équilibre propres à la réaction de transfert et à la réaction d'épimérisation limite d'autre part l'influence que peut avoir la production d'UDP [^{12}C]Gal par l'épimérase sur la réalisation de l'équilibre de la réaction de transfert. Dans le cas d'un extrait de cellules possédant une épimérase très active, la linéarité du dosage en fonction de la quantité d'extrait (de 0 à 200 μg de bactéries par ml. de suspension) et en fonction du temps d'incubation (de 0 à 30 min) est stricte tant que 15% au moins du [^{14}C]Gal-l-P n'a pas été converti. L'addition de phosphoglucomutase (et de glucose-1-6 diphosphate), effectuée dans le but de déplacer l'équilibre de la réaction de transfert, n'a pas paru élargir suffisamment la zone de proportionnalité du dosage pour justifier l'addition systématique de cette enzyme accessoire.

L'activité relative de la transférase dans divers échantillons est directement connue en comparant la radioactivité retenue sur les microfiltres, après soustraction de la contamination systématique (la rétention de galactose-1-phosphate par le charbon est inférieure à 0.5%). La détermination de l'activité absolue de l'enzyme nécessite l'introduction de deux corrections. La première est imposée par l'adsorption incomplète de l'UDP Gal et de l'UDP Glu (variant de 70 à 80% d'une expérience à l'autre mais remarquablement constante pour les échantillons d'une même expérience); la fraction résiduelle est estimée, avant filtration, dans le surnageant des tubes d'incubation, par une lecture de l'absorption à 260 μm . La seconde correction concerne la selfabsorption: la filtration d'un précipité de radioactivité connue, auquel avait été incorporée une quantité égale de charbon, a permis de l'estimer à 30% environ. La quantité de [^{14}C]Gal transféré à la fraction nucléotidique est donc sensiblement double de celle que l'on déduit de la mesure directe de la radioactivité fixée sur charbon.

(c) *Dosage de l'épimérase*

Le dosage a été en général réalisé par la technique "en deux temps" de Kalckar *et al.* (1959). Les suspensions étaient soumises pendant 120 sec aux vibrations d'un oscillateur Mullard et les extraits débarrassés des débris cellulaires par centrifugation. Les tubes d'incubation contenaient, en un volume de 200 μl .: 0.3 μM -UDP Gal; 50 μM -tampon glycine-NaOH, pH 8.7. La réaction était provoquée par addition de 40 μl . d'extrait bactérien, et arrêtée par un traitement de 90 sec à 100°C, suivi d'un refroidissement immédiat à 0°C. Pour chaque extrait trois déterminations étaient effectuées correspondant respectivement à 0 (addition d'UDP Gal après ébullition), 2.5, et 5 min d'incubation à 37°C. Dans un second temps, au contenu des tubes d'incubation étaient ajoutés 2.5 μM

DPN, 100 μ M tampon glycine à pH 8.7 et environ 100 unités d'uridinediphosphoglucosedeshydrogénase. Le contenu des tubes était complété à 1 ml. et l'adsorption à 340 m μ était suivie jusqu'à ce qu'on observe un plateau. Pour chaque molécule d'UDP Glu formée par l'épimérase, deux molécules de DPN sont réduites.

(d) *Détermination de l'activité de la galactose-perméase*

L'activité du système de perméation du galactose a été déterminée chez les mutants dépourvus de galactokinase en utilisant la technique isotopique de Horecker *et al.* (1960).

3. Résultats

(a) *Biosynthèse induite de la galactokinase*

Conditions expérimentales

Toutes les expériences d'induction ont été réalisées en milieu minéral synthétique 63; sauf mention particulière, la source carbonée était constituée par du glycérol (2 à 4 g/l.). Une suspension de bactéries en croissance exponentielle (2×10^7 à 2×10^8 cellules/ml.) était répartie entre des fioles agitées à 37°C contenant soit l'inducteur et éventuellement l'inhibiteur de l'induction, soit un volume équivalent d'eau. Aux temps choisis, 1 ml. de suspension était prélevé dans un tube, contenant une goutte de toluène ainsi qu'une goutte calibrée d'un mélange fraîchement préparé à parties égales de β -mercaptoéthanol (2 M) et de *magnesium-titriplex* (4×10^{-2} M). Après quelques instants d'agitation, les tubes étaient placés à 37°C pour extraction de l'enzyme.

Les inducteurs et inhibiteurs étaient généralement utilisés à des concentrations auxquelles ils n'exerçaient pas d'inhibition significative sur la vitesse de phosphorylation du substrat radioactif. Chaque fois que l'inhibition était mesurable dans une expérience de contrôle, la correction nécessaire a été effectuée. Lorsqu'un substrat inducteur de forte affinité tel que le galactose était utilisé à une concentration élevée, dans une expérience de cinétique, les prélèvements étaient effectués dans des tubes contenant du dinitrophénol (5×10^{-3} M) et les cellules étaient centrifugées en présence de ce composé avant qu'il soit procédé à l'extraction. D'une façon générale la centrifugation a été évitée en raison de l'imprécision qu'elle introduisait.

Induction par le D-galactose

L'activité de base de la galactokinase mesurée dans les conditions précédemment décrites chez les souches d'*E. coli* K12 cultivées en milieu au glycérol variait, selon les clones et selon les expériences entre 0.4 et 1 unité d'enzyme par mg de bactéries. L'activité dans la souche Hfr H en phase exponentielle de croissance en milieu galactosé (2 g/l.), après environ 8 doublements en présence de ce sucre, a été trouvée égale à 9.6 unités, soit 10 fois l'activité de la culture témoin en milieu au glycérol. La synthèse d'enzyme induite par des concentrations de galactose supérieures ou égales à 10^{-4} M est décelable très tôt: le taux différentiel de synthèse semble stabilisé moins de 5 min après l'addition d'inducteur. Cette synthèse cesse lorsque le galactose, qui paraît être consommé préférentiellement au glycérol, a été épuisé (Fig. 1, courbe (b)). La biosynthèse de l'enzyme ne se poursuit donc pas en l'absence du substrat inducteur. Une telle propriété est commune aux différents systèmes inductibles décrits chez *E. coli* (à la différence de la pénicillinase de *B. cereus*, chez qui une fixation irréversible de quantités infinitésimales de pénicilline suffit pour entretenir une induction prolongée de l'enzyme (Pollock, 1950)); la cinétique d'induction de la galactokinase vérifie donc l'observation générale selon laquelle l'induction n'élève

pas le nombre de centres formateurs de la protéine inductible si l'on réserve, comme cela paraît logique, cette dénomination à des structures cellulaires stables susceptibles de servir de matrices à la formation d'un nombre indéfini de molécules d'enzyme; elle est en accord avec les résultats d'expériences récentes (Attardi, Naono, Gros, Brenner & Jacob, 1962; Attardi, Naono, Gros, Buttin & Jacob, 1963), que nous aurons l'occasion de rappeler ultérieurement et qui établissent que le processus de répression, inactivé lors de l'induction de cette enzyme, agit sur la synthèse d'une matrice ribonucléique à vie très brève (ARN-messager).

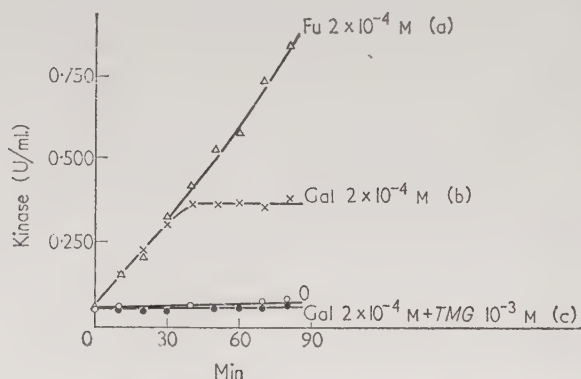


FIG. 1. Induction de la galactokinase par de faibles concentrations de galactose ou de fucose et inhibition de l'induction par le TMG (souche 3300).

Spécificité de l'induction

L'aptitude à induire la biosynthèse de la galactokinase a été recherchée chez différents composés de configuration moléculaire voisine de celle du D-galactose. Les principaux résultats figurent dans le Tableau 1. On observe qu'aux concentrations relativement élevées qui ont été utilisées, seuls parmi ces composés le D-fucose (6-désoxygalactose) et les α - et β -fluorogalactosides ont un effet positif comparable à

TABLEAU 1

Induction de la galactokinase par divers analogues structuraux du D-galactose†

Composé	Substitué en	Concentration	Taux d'induction‡
D-galactose	—	2×10^{-4} M	11.0
α -(et β)-1-fluoro-D-galactose	1	2×10^{-4} M	11.0
D-galactosamine	2	4×10^{-3} M	1.0
2-6-oxy-méthyl-D-galactose	2+6	4×10^{-3} M	1.0
4-oxy-méthyl-D-galactose	4	10^{-3} M	1.0
L-galactose	5	4×10^{-3} M	1.0
Acide D-galacturonique	6	2×10^{-3} M	1.0
L-arabinose	6	4×10^{-3} M	3.5
D-fucose (6-désoxy-D-galactose)	6	4×10^{-3} M	15.0
6-oxy-méthyl-D-galactose	6	10^{-3} M	1.0
α -D-gala-L-manno-heptose	6	10^{-3} M	1.0

† Souche C600Sr: à l'exception des expériences relatives au L-arabinose et à l'acide D-galacturonique qui ont été réalisées avec la souche Hfr H.

‡ Taux d'induction: taux différentiel de synthèse de la culture induite (suivi de 15 en 15 min environ pendant les 90 premières minutes de culture en présence d'inducteur) rapporté au taux de synthèse du témoin non induit.

celui du D-galactose. L'induction par les α - et β -fluorogalactosides ne peut toutefois pas être attribuée à ces composés eux-mêmes, car, même chez les souches dépourvues des α - ou β -galactosidases respectivement indispensables (Van Hofsten, 1961) à l'hydrolyse enzymatique de l'un ou l'autre composé, l'hydrolyse spontanée de ces galactosides libère du galactose en quantité suffisante pour assurer la croissance des cellules. La spécificité de l'induction apparaît donc stricte; à part le galactose, seul parmi les composés utilisés le D-fucose, paraît capable d'induire efficacement l'enzyme.

Induction "gratuite" par le D-fucose

L'induction par le D-fucose est caractérisé par les propriétés suivantes.

(1) Le D-fucose est un inducteur d'efficacité supérieure à celle du D-galactose. Aux concentrations égales ou supérieures à 10^{-3} M, le fucose induit chez la souche 3300 la biosynthèse de la galactokinase sans latence appréciable (Fig. 2). La concentration

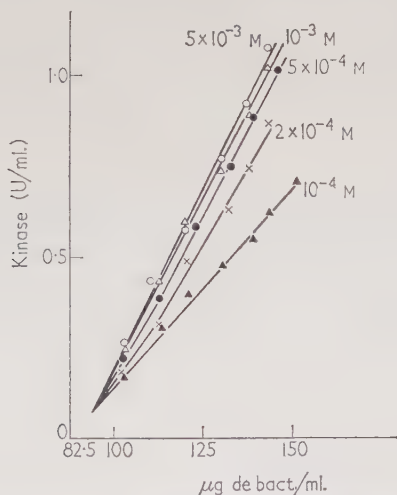


Fig. 2. Cinétique initiale d'induction par différentes concentrations de D-fucose (souche 3300).

2×10^{-4} M de cet inducteur demeure saturante, le taux maximal de synthèse étant atteint après un temps de culture inférieur à 5 min. Le *taux différentiel de synthèse*† induite par le fucose 2×10^{-3} M, mesuré au cours du premier doublement suivant l'addition d'inducteur, a été trouvé sensiblement plus élevé (16U/mg de bactéries) que le taux différentiel de synthèse induite dans la même expérience par le galactose 10^{-2} M (11U/mg). Cette différence est très vraisemblablement significative car elle a été régulièrement observée lors de la détermination de l'activité spécifique de la galactokinase dans des suspensions de cellules ayant effectué leur croissance soit sur galactose, soit sur un milieu au glycérol en présence de concentrations saturantes de fucose. Bien que le *taux maximal d'induction*‡ par le fucose demeure modeste

† Le *taux différentiel de synthèse* d'une protéine enzymatique est mesuré par l'accroissement de l'activité de cette enzyme par unité d'accroissement de la masse bactérienne totale (Monod, Pappenheimer & Cohen-Bazire, 1952).

‡ Nous définirons le "*taux d'induction*" comme le rapport entre le taux différentiel stable de synthèse induite par une concentration définie d'inducteur et le taux différentiel de synthèse mesuré chez la même souche non induite; ce taux est évidemment égal au rapport des activités spécifiques des suspensions lorsque la culture induite s'est développée pendant un temps suffisant en présence d'inducteur.

(inférieur à 20), il semble que cet inducteur assure une dérépression presque totale de la synthèse de l'enzyme: l'activité de la galactokinase chez sept mutants constitutifs isolés par deux techniques différentes (Buttin, 1963) est dans la plupart des cas équivalente à celle des bactéries pleinement induites par la fucose et n'atteint jamais une valeur double de celle-ci.

(2) *Le D-fucose n'est pas utilisable comme source carbonée énergétique.* La croissance des bactéries n'a pas lieu lorsque ce sucre constitue la seule source carbonée disponible

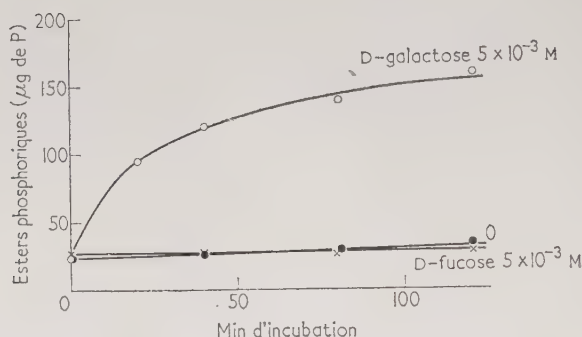


FIG. 3. Détermination de la quantité de phosphore appartenant aux esters phosphoriques formés au cours de l'incubation de galactose ou de fucose et d'ATP en présence de galactokinase. Chaque tube d'incubation contenait en un volume de 1 ml. : 3 mg ATP, sel de sodium; 5 μ M $MgCl_2$; 200 μ M-tampon glycylglycine, pH 7.5; 80 μ M- β -mercaptoéthanol; éventuellement 5 μ M-galactose ou fucose. La réaction était arrêtée par addition de 0.2 ml. d'acide trichloracétique à 30%. Après centrifugation, les surnageants étaient portés à pH 8.2 par NaOH et le phosphore nucléotidique était précipité par l'acétate de baryum. Le phosphore contenu dans les esters phosphoriques d'oses a été dosé dans les surnageants par la technique de King (1932).

(3) *Le D-fucose n'est pas un substrat de la galactokinase.* (a) On sait que la croissance en milieu minéral au glycérol des mutants déficients en transférase est inhibée par de très faibles concentrations de galactose (Kurahashi & Wahba, 1958); la présence de ce sucre provoque la lyse des mutants dépourvus d'épimérase (Yarmolinsky, Wiesmayer, Kalckar & Jordan, 1959; Nikaido, 1961); l'un et l'autre phénomène ne s'observent que chez des cellules disposant d'une galactokinase active, ce qui indique que la phosphorylation du galactose est indispensable à leur manifestation. Il ne se forme pas d'ester doué de propriétés semblables lorsque la croissance s'effectue en présence de fucose: la croissance de la souche PL2, dépourvue d'épimérase, en milieu au glycérol (ou en milieu tryptonné) n'est pas affectée par la présence de fucose 10^{-3} M, alors que le galactose 10^{-4} M provoque la lyse de la population cellulaire témoin, et qu'à la concentration 10^{-5} M de ce sucre, on observe encore une inhibition transitoire mais très significative de la croissance des bactéries. Le fucose 10^{-3} M n'a également aucun effet sur le développement des cellules de la souche 138-10 (dépourvue de transférase) dont le galactose 10^{-4} M provoque la bactériostase.

(b) Aucune formation d'ester phosphorique n'a été mise en évidence au cours de l'incubation de fucose et d'ATP en présence d'une préparation partiellement purifiée de galactokinase, qui phosphoryle activement le galactose (Fig. 3).

(c) La phosphorylation enzymatique des oses s'accompagne d'une libération de fonctions acides à partir de l'ATP. La technique photométrique décrite par De Robichon-Szulmajster (1958) a été utilisée pour suivre la dégradation de l'ATP par

un extrait brut de cellules induites. Les résultats exprimés par la Fig. 4 montrent clairement qu'aucun système enzymatique présent dans l'extrait (réalisé à partir de cellules induites par le fucose) ne dégrade l'ATP de façon décelable lorsque le fucose est le seul composé susceptible d'être utilisé comme cosubstrat alors que l'adjonction de galactose provoque une acidification progressive et très marquée du milieu d'incubation.

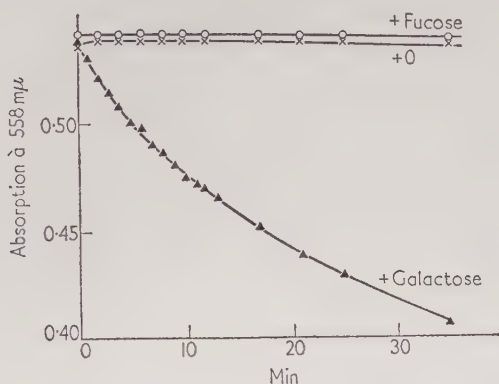


FIG. 4. Mise en évidence de la libération d'une fonction acide de l'ATP au cours de la phosphorylation du galactose par un extrait brut d'*E. coli*. Les cuvettes d'incubation contenaient en un volume de 1 ml.: $4 \mu\text{M}$ -ATP, pH 7.55 par KOH; $2 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ -phénolsulfonephthaléine; $5 \mu\text{M}$ - MgCl_2 ; éventuellement $3.3 \mu\text{M}$ -galactose ou fucose; $2 \mu\text{M}$ -tampon PO_4HNa_2 - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$, pH 7.55; extrait bactérien $50 \mu\text{l}$. L'extrait ($25 \mu\text{g}$ de bactéries/ml. a été obtenu par traitement sonique de bactéries induites, centrifugation et reprise du surnageant en β -mercaptoéthanol 10^{-1} M . Le changement de coloration de l'indicateur est suivi pour $\lambda = 558 \text{ m}\mu$ à 37°C .

(d) Le fucose ne paraît pas avoir d'affinité mesurable pour la galactokinase: aucune inhibition compétitive significative de la phosphorylation du galactose n'a été mise en évidence lors de l'addition de concentrations variées de fucose à des échantillons contenant différentes concentrations de ce substrat, même lorsque la concentration du fucose était 20 fois supérieure à celle du galactose. L'inhibition non compétitive par des concentrations de fucose aussi élevées que 10^{-2} M est inférieure à 10% (Tableau 2).

TABLEAU 2

Quantité de [^{14}C]galactose (μmoles) phosphorylé en présence de concentrations variées de D-fucose

	$2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ($500 \mu\text{M}$)	Galactose 10^{-3} M ($250 \mu\text{M}$)	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($125 \mu\text{M}$)
+0	77.0	73.0	—
+D-fucose $2 \times 10^{-3} \text{ M}$	73.0	67.0	41.5
+D-fucose $5 \times 10^{-3} \text{ M}$	74.0	71.0	42.0
+D-fucose $2 \times 10^{-2} \text{ M}$	72.5	68.0	42.0

Les tubes d'incubation (20 min à 37°C) contenaient: $50 \mu\text{l}$. solution de [^{14}C]galactose (q.s.p. concentration finale indiquée); $50 \mu\text{l}$. solution de D-fucose (q.s.p. concentration finale indiquée) ou H_2O ; $100 \mu\text{l}$. extrait bactérien en milieu 63 additionné de *magnesium-titriplex* 10^{-3} M et de β -mercaptoéthanol $5 \times 10^{-2} \text{ M}$; et en un volume total de $50 \mu\text{l}$.: $0.4 \mu\text{M}$ -ATP; $0.33 \mu\text{M}$ - MgCl_2 ; $8 \mu\text{M}$ -glycylglycine, pH 7.5; $0.8 \mu\text{M}$ -NaF.

Il ne paraît donc pas douteux que l'incapacité du fucose à assurer la croissance des bactéries provient de ce que la phosphorylation initiale de ce sucre ne se produit pas. Il en résulte que la biosynthèse de galactokinase est induite par ce composé dans des conditions de complète "gratuité", au sens où ce terme a été employé par Monod & Cohn (1952): l'induction ne saurait conditionner ni influencer de façon significative le métabolisme des cellules. Dans ces conditions, le taux différentiel de synthèse de l'enzyme induite par des concentrations suffisamment élevées de cet inducteur paraît stabilisé de façon pratiquement instantanée (Figs. 2 et 5).

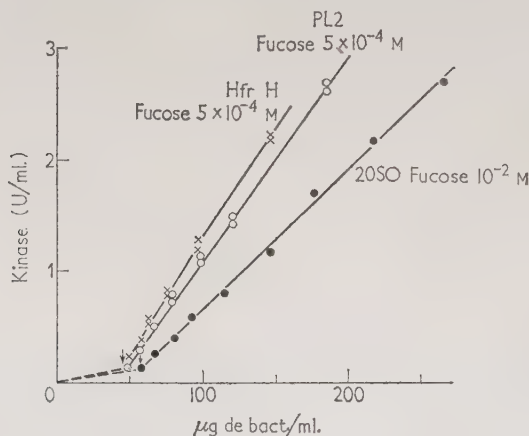


FIG. 5. Taux différentiel de synthèse de la galactokinase chez différentes souches d'*E. coli* cultivées en présence de concentrations saturantes de fucose. La souche PL2 est un mutant dépourvu d'épimérase d'Hfr H. La différence mise en évidence entre le taux de synthèse des souches Hfr et celui de la souche cryptique F⁻ 20SO n'est pas particulier à cette souche; en règle générale, chez les souches F⁻ utilisées au cours de ces expériences, l'activité maximale de la galactokinase était sensiblement inférieure (30 à 50%) à celle qui s'observe chez les clones dérivant de Hfr H. (Mesures d'activité: conditions décrites à l'exception de la concentration de [¹⁴C]Gal: 2×10^{-3} M. La flèche indique l'instant où est ajouté l'inducteur.)

(4) *Le D-fucose n'est pas consommé à une vitesse appréciable au cours de l'induction.* Le fait que le fucose ne soit pas un substrat de la galactokinase n'exclut pas la possibilité que, en présence d'une source énergétique complémentaire, ce composé soit assimilé par une voie différente de la voie métabolique du galactose. Cependant, si un tel métabolisme existe, il ne convertit l'inducteur exogène en dérivés inactifs qu'en quantité très faible. En effet:

(a) des cellules (Hfr H)ensemencées à raison de 5 µg/ml. environ et cultivées en présence de fucose 2×10^{-4} M demeurent pleinement induites après que l'accroissement de masse bactérienne effectué en présence de cette faible concentration d'inducteur ait atteint 500 µg/ml. Lorsqu'elle a effectué une croissance équivalente, une culture-témoin qui a reçu initialement la même quantité de galactose par unité de volume a une activité qui n'excède pas l'activité de base des cellules non induites, les divisions cellulaires ultérieures ayant considérablement dilué l'enzyme synthétisée en présence de ce substrat (voir cinétique initiale de l'induction Fig. 1(a) et (b));

(b) la présence d'inducteur a été recherchée dans le surnageant de deux cultures, l'une en milieu galactosé 10^{-2} M (soit environ 2 g/l.), l'autre en milieu au glycérol (2 g/l.) additionné de fucose 10^{-2} M, après épuisement des sources carbonées respectives, carence des cellules, centrifugation et filtration des surnageants sur

membranes "Millipore". Un volume de chaque surnageant a été ajouté à 50 volumes d'une suspension cellulaire en croissance exponentielle en milieu au glycérol et la synthèse de la galactokinase a été suivie pendant un doublement. Le taux différentiel de synthèse, dans la culture qui a reçu le surnageant qui contenait primitivement du fucose (à une concentration finale correspondant au plus à 2×10^{-4} M) se stabilise presque instantanément à sa valeur maximale, comme on doit le prévoir si la concentration de fucose n'a pas diminué pendant la première phase de l'expérience. L'activité inductrice du surnageant de la culture en milieu galactosé est nulle.

Inhibition spécifique de l'induction

Nous avons cherché à mettre en évidence parmi les composés de configuration moléculaire voisine de celle du D-galactose des dérivés qui, incapables d'induire la biosynthèse de l'enzyme, seraient spécifiquement aptes à inhiber l'induction. Aux concentrations précédemment choisies pour tester leur capacité à induire (voir Tableau 3) la D-galactosamine, le 2-6-oxy-méthyl-D-galactose, le 4-oxyméthyl-D-galactose, le

TABLEAU 3

Inhibition par les β -D-thiogalactosides de l'induction de la galactokinase

Composé	Concentration	Inducteur	Inhibition de l'induction†	
			Souche 3300‡	Souche C600Sr‡
Galactosido- β -D-thiogalactoside	.. 4×10^{-3} M	D-fucose 4×10^{-3} M	—	< 20%
	.. 10^{-3} M	D-fucose 4×10^{-3} M	53%	—
Méthyl- β -D-thiogalactoside (TMG)	.. 5×10^{-4} M	D-fucose 10^{-3} M	> 95%	—
	.. 10^{-3} M	D-fucose 10^{-3} M	> 95%	85%
	.. 10^{-3} M	D-galactose 2×10^{-4} M	> 95%	—
	.. 10^{-3} M	D-fucose 4×10^{-3} M	> 95%	—
Isopropyl- β -D-thiogalactoside	10^{-3} M	D-fucose 4×10^{-3} M	70%	—
Phényl- β -D-thiogalactoside	10^{-3} M	D-fucose 4×10^{-3} M	90%	—

† Déterminée, sauf mention particulière, après 80 min de culture en présence soit d'inducteur seul, soit d'inducteur et d'inhibiteur.

‡ La souche 3300 synthétise constitutivement la β -galactoside-perméase qui assure la concentration des β -D-thiogalactosides; la souche C600Sr est dépourvue de ce système de perméation.

L-galactose, le L-fucose, l' α -D-gala-L-mannoheptose, le 6-oxyméthyl-D-galactose n'inhibent pas de façon significative l'induction par une concentration égale de D-fucose. L'acide D-galacturonique 10^{-3} M inhibe de 25% environ l'induction par le D-fucose 10^{-3} M chez la souche Hfr H.

Différents thio- β -D-galactosides aliphatiques ou aromatiques inhibent l'induction de la galactokinase, à des degrés divers (Tableau 3). L'inhibiteur le plus puissant parmi ceux-ci est le TMG. La courbe (c) (Fig. 1) illustre cette propriété. Ces résultats permettent de formuler plusieurs remarques.

(a) A des concentrations suffisantes pour inhiber totalement l'induction de la galactokinase (10^{-3} M), le TMG n'exerce aucun effet décelable sur la concentration du galactose 2×10^{-4} M par les cellules (Horecker *et al.*, 1960). L'action inhibitrice spécifique immédiate des thiogalactosides s'exerce donc nécessairement au niveau d'un site *intracellulaire* impliqué dans le phénomène d'induction.

(b) Il a été établi (Monod & Cohn, 1952) que les thiogalactosides ne sont pas hydrolysés par les cellules d'*E. coli* et ne peuvent pas servir de source énergétique pour cette bactérie. Leur présence dans le milieu de culture n'affecte pas le taux de croissance. Ces composés constituent donc des inhibiteurs "gratuits" de l'induction.

(c) Les thiogalactosides aliphatiques (dont le TMG) sont de puissants inducteurs de la biosynthèse de la β -galactosidase et de la galactoside-perméase (Buttin, 1955). Les thiogalactosides aromatiques au contraire, et en particulier le thiophénylgalactoside, inhibent compétitivement l'induction de ces protéines. Des dérivés de l'une et l'autre classe se comportent cependant comme des inhibiteurs de la biosynthèse de la galactokinase, et il est vraisemblable que cette inhibition est elle-même du type compétitif: l'activité biologique des divers thiogalactosides dans les deux systèmes inductibles considérés est manifestement reliée à la configuration du groupement aglycone par une loi différente; il est donc probable que leur intervention dans la régulation des biosynthèses de β -galactosidase et de galactokinase prend effet au niveau de deux sites cellulaires distincts.

Inhibition non spécifique de l'induction: "effet glucose"

Lorsque les cellules sont cultivées sur milieu minéral glucosé, l'induction des systèmes cataboliques adaptatifs est, en règle générale, fortement inhibée (Monod, 1942; Epps & Gale, 1942; Magasanik, 1955). Cette propriété concerne l'induction de la galactokinase: l'induction par le fucose 4×10^{-3} M est inhibée de façon pratiquement complète lorsque la croissance des cellules a lieu sur milieu synthétique dont le glucose (2.5 g/l.) constitue le seul aliment carboné. L'activité de base de la souche Hfr H cultivée en milieu glucosé est elle-même réduite à 40% environ de celle qui s'observe en milieu au glycérol.

Induction de souches dépourvues de galactose-perméase

L'observation d'une souche (20SO) capable de se développer sur un milieu solide galactosé (6 g de galactose/l.), chez laquelle de faibles concentrations d'inducteur n'induisaient pas la biosynthèse de galactokinase, suggérait qu'il pouvait s'agir d'un mutant dépourvu de galactose-perméase; cette hypothèse a été vérifiée.

(1) Conditions d'induction de la souche 20SO: le galactose, 2×10^{-4} M ou 5×10^{-4} M, n'induit pas de façon significative la biosynthèse de galactokinase dans la souche 20SO en 60 minutes de culture; la plus faible de ces deux concentrations induit la biosynthèse de cette enzyme à un taux maximal dans la souche témoin 3300. Le taux d'induction par le fucose 10^{-3} M chez la souche 20SO est inférieur à 3 (cinétique suivie pendant un doublement). La souche 20SO a été cultivée soit sur glycérol en présence de concentrations variées de fucose, soit sur galactose à la concentration initiale de 10^{-2} M: elle apparaît normalement inductible par des concentrations de galactose ou de fucose égales à 10^{-2} M (Tableau 4 et Fig. 5).

(2) Mise en évidence de l'absence de galactose-perméase: la technique isotopique qui permet la détermination cinétique directe de la quantité de galactose libre intracellulaire réalisée à partir de galactose exogène de très faible concentration n'est applicable à l'étude spécifique précise de l'activité de la galactose-perméase que chez les souches dépourvues de galactokinase: chez les souches sauvages, en effet, le galactose irréversiblement incorporé représente très tôt la fraction essentielle du galactose intracellulaire et masque le phénomène étudié. Nous avons isolé (Buttin, 1963) et caractérisé un mutant de la souche 20SO dépourvu de galactokinase (20SOK⁻).

La capacité de la souche 20SOK⁻ à concentrer le galactose 5×10^{-5} M a été comparée à celle d'une souche témoin (B34-5) également dépourvue de galactokinase, isolée à partir de la souche C600Sr. Les résultats sont reproduits dans le Tableau 5. Il est clair que la souche 20SOK⁻, préinduite ou non, n'accumule pas de galactose. L'incapacité à concentrer l'inducteur rend compte des propriétés particulières de la souche 20SO dont elle dérive, au regard du phénomène d'induction.

TABLEAU 4

Souche	Exp. No.	Glycérol (non induite)	Galactose 10^{-2} M†		Glycérol + Fucose 1.5×10^{-3} M†		Glycérol + Fucose 5×10^{-3} M†		Glycérol + Fucose 10^{-2} M†	
		U/mg	U/mg	Taux d'induction	U/mg	Taux d'induction	U/mg	Taux d'induction	U/mg	Taux d'induction
B34-5	1	0.7	7.5	10.0	10.0	14.0	—	—	—	—
	2	0.6	—	—	7.7	13.0	9.2	15.0	7.9	13.0
20SOK ⁻	1	0.4	4.2	10.0	1.4	3.5	—	—	—	—
	2	0.4	—	—	1.6	4.0	4.8	10.0	5.5	14.0

Cellules ayant effectué plus de six doublements en présence d'inducteur.

TABLEAU 5

Activité de la galactose-perméase chez les souches B34-5 et 20SOK⁻

Souche	Préculture	mμM de [¹⁴ C]Gal intracellulaire/mg de bactéries				
		Après incubation en présence de [¹⁴ C]Gal 5×10^{-5} M pendant:				14 min après chassage† du [¹⁴ C]Gal par du [¹² C]Gal 10^{-2} M
		1 min	7 min	12 min	19 min	
B34-5	Glycérol	10.4	23.8	—	33.5	1.0
	Glycérol + TMG 5×10^{-3} M‡	3.5	7.3	—	12.6	0.8
20SOK ⁻	Glycérol	0.0	0.05	0.07	—	—
	Glycérol + Fucose 2×10^{-3} M§	0.06	0.07	0.12	—	—

† Opéré après 11 min d'incubation en présence de [¹⁴C]Gal 5×10^{-5} M.

‡ Préculture en présence de TMG 2×10^{-3} M pendant environ cinq doublements, puis en présence de TMG 5×10^{-3} M pendant deux doublements.

§ Préculture pendant un doublement en présence d'inducteur.

(b) *L'induction simultanée de la séquence enzymatique*

Induction simultanée de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase.

Le fucose n'étant pas un substrat de la galactokinase ne saurait induire la transférase ou l'épimérase, si l'induction de ces enzymes était réalisée par un processus séquentiel, au sens donné à ce terme par Stanier (1951)). Les résultats rapportés dans le Tableau 6 montrent que, chez la souche sauvage Hfr H, le fucose induit la biosynthèse de l'une et l'autre enzyme à des taux comparables au taux d'induction de la galactokinase elle-même: les trois enzymes sont donc *simultanément* inductibles par un inducteur commun.

Un corollaire évident de cette propriété est que, si la chaîne métabolique du galactose est interrompue par une lésion génétique affectant spécifiquement le déterminant de structure de l'une des enzymes, l'induction "gratuite" de la biosynthèse des autres enzymes ne doit pas être affectée.

Nous avons comparé l'activité spécifique des trois enzymes, chez différents mutants cultivées en présence et en absence de fucose (Tableau 6).

TABLEAU 6

Induction par le D-fucose 5×10^{-4} M des enzymes d'utilisation du galactose chez Hfr H et chez différents mutants de cette souche

Souche	Galactokinase†			Transférase†			Epimérase†		
	Activité (U/mg)		Taux d'induction	Activité (U/mg)		Taux d'induction	Activité (U/mg)		Taux d'induction
	Non induit	Induit		Non induit	Induit		Non induit	Induit	
Hfr H	0.6	11.1	18	0.5	8.1	16	5	65	13
138-10	0.6	9.3	15	< 0.1	< 0.2	—	6	67	11
PL2	0.7	11.6	16	0.4	5.8	14	< 1	< 1	—
112-19	< 0.05	< 0.05	—	0.7	7.3	10	—	—	—

† Activités de suspensions en voie de croissance, mesurées après traitement des cellules à l'oscillateur son Mullard. Les extraits destinés à la mesure de la galactokinase et de la transférase étaient réalisés en présence de *magnesium-triisopropyl* 2×10^{-3} M et de β -mercaptoéthanol 5×10^{-2} M.

(a) Il est clair que lorsqu'une mutation supprime spécifiquement l'activité de la transférase (souche 138-10) ou celle de l'épimérase (souche PL2), le fucose induit la synthèse des deux autres enzymes avec autant d'efficacité que chez le parent sauvage.

(b) Lorsqu'un mutant est déficient en galactokinase, les activités basales de la transférase et de l'épimérase sont ordinairement très supérieures à celles du parent sauvage (Yarmolinsky, Jordan & Wiesmayer, 1961). Ce phénomène sera décrit plus précisément au prochain paragraphe. Il est possible cependant d'isoler occasionnellement des mutants de cette classe chez lesquels les activités de ces enzymes sont demeurées réduites: chez un tel mutant, la transférase est induite à son taux maximal par le fucose (Tableau 6: souche 112-19). L'addition de TMG (10^{-3} M) inhibe totalement l'induction de transférase par le fucose (10^{-3} M) dans cette souche (cinétique d'induction suivie pendant un doublement).

Induction de la galactose-perméase

Chez la plupart des mutants dépourvus de galactokinase, la synthèse de la transférase et de l'épimérase s'effectue au taux caractéristique de cellules pleinement induites. Le phénomène a été découvert par Kalckar *et al.* (1959) et analysé par Yarmolinsky *et al.* (1961). Ces auteurs ont, en particulier, montré que si la culture de ces cellules était poursuivie en présence de TMG, le taux de synthèse de transférase était réduit à une valeur voisine de celle qui s'observe chez les bactéries de génotype sauvage; ils ont conclu de l'ensemble de leurs observations que la synthèse constitutive mise en évidence chez ces mutants traduisait l'accumulation d'un inducteur interne, la galactokinase jouant un rôle "régulateur" qui pourrait consister à

phosphoryler irréversiblement un dérivé endogène du galactose doué de propriétés inductrices. Les propriétés de la galactose-perméase au regard du phénomène d'induction confirment cette interprétation.

Dans la souche d'*E. coli* ML32.400, dépourvue de galactokinase, utilisée par Horecker *et al.* (1960) pour étudier les propriétés de la galactose-perméase d'*E. coli*, ce système est synthétisé constitutivement. Mais dès lors qu'un rôle régulateur est reconnu à la galactokinase, il n'est plus légitime de transposer ce résultat au cas des cellules de génotype sauvage. Cette restriction est accentuée par l'observation que, chez la souche ML32.400, qui est déficiente en galactokinase et en transférase, l'épimérase—une enzyme reconnue inductible chez les souches sauvages—est synthétisée constitutivement (Yarmolinsky *et al.*, 1959).

Nous avons donc recherché si la préculture en présence de TMG réduisait l'activité de la galactose-perméase chez un mutant dépourvu de galactokinase (souche B34-5) qui, par l'effet de cette mutation, synthétise la transférase de façon entièrement constitutive: la vitesse initiale de concentration du galactose 5×10^{-5} M est réduite de 70% à la suite d'une préculture poursuivie pendant plus de deux doublements en présence de TMG 5×10^{-3} M (Tableau 5). Ce résultat suggère fortement que la galactose-perméase est elle-même induite par un composé endogène chez les souches dépourvues de galactokinase. Mais il s'est avéré possible de mettre en évidence de façon plus directe l'inductibilité de ce système. Nikaido (1961) a montré que lorsque des cellules d'Entérobacteriacées sont cultivées dans un milieu ne contenant pas de galactose, ce sucre et ceux de ses dérivés qui participent à la constitution des polysaccharides de la paroi cellulaire ne sont synthétisés que par l'intervention de l'épimérase, suivant la réaction initiale: $\text{UDP Glu} \rightleftharpoons \text{UDP Gal}$.

Compte tenu de la spécificité de l'induction, la formation d'un inducteur interne est alors très peu probable dans des cellules dépourvues d'épimérase; et si cette hypothèse est exacte, chez un mutant dépourvu simultanément de galactokinase et d'épimérase, la biosynthèse de toute enzyme dépendant de ce système de régulation devrait présenter le caractère inductible qui la caractérise chez le parent sauvage. L'activité de la galactose-perméase a été déterminée après culture en présence et en absence d'inducteur, chez un mutant (souche B34-10) dépourvu simultanément des activités de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase.

Les résultats rapportés Fig. 6 indiquent clairement que la galactose-perméase est inductible, dans la souche triplement déficiente, par une faible concentration de galactose exogène. La préculture effectuée pendant un seul doublement en présence de fucose 10^{-3} M double la vitesse initiale d'accumulation du galactose 5×10^{-5} M par cette souche. La galactose-perméase est donc induite dans la souche triplement déficiente par les composés qui, chez le parent sauvage, induisent la biosynthèse des autres enzymes du métabolisme du galactose. Il paraît peu douteux que, chez les souches dépourvues de la seule activité de la galactokinase, ce système est induit par un galactoside endogène; et que, chez les souches sauvages, son activité varie dans une large mesure de façon parallèle à l'activité des autres enzymes de la même séquence métabolique. Il est intéressant de remarquer enfin que, chez le mutant triplement déficient, l'activité de la galactose-perméase demeure très significative en absence de tout inducteur, exogène ou endogène. Ceci suggère que, d'une façon plus générale, la marge relativement étroite d'inductibilité des enzymes d'utilisation du galactose traduit plus probablement une expression partiellement constitutive des gènes de structure correspondants que le résultat d'une induction interne limitée

mais permanente: une telle interprétation est fortifiée par l'observation que les activités basales de la galactokinase ou de la transférase n'ont pas été trouvées plus faibles chez un mutant dépourvu d'épimérase (souche PL2) que chez le parent sauvage (Fig. 5 et Tableau 6).

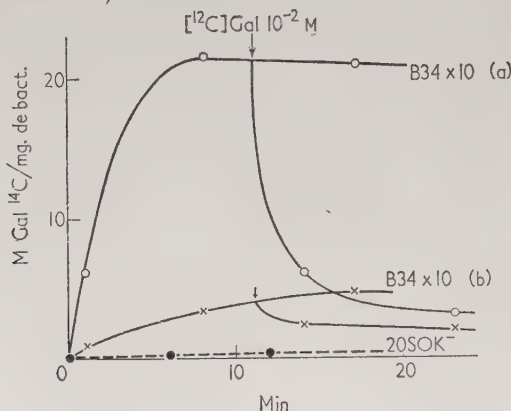


FIG. 6. Induction de la galactose-perméase dans la souche triplement déficiente B34-10. Des suspensions précultivées en milieu glyciné en présence (courbe (a)) ou en absence (courbe (b)) de galactose 2×10^{-4} M, ont été centrifugées, reprises en milieu glyciné additionné de chloramphénicol ($50 \mu\text{g/ml.}$) et agitées à 25°C . Deux échantillons de 5 ml. de chaque culture ont été incubés en présence de $[^{14}\text{C}]\text{Gal } 5 \times 10^{-5}$ M; dans le premier échantillon, des prélèvements de 1 ml. ont été effectués à différents temps, les cellules étant filtrées sous vide sur membranes "Millipore" et instantanément lavées par du milieu 63 à 0°C ; dans le second, du $[^{12}\text{C}]\text{Gal}$ a été ajouté après 11 min d'incubation, et deux prélèvements ont été effectués afin de suivre le déplacement du $[^{14}\text{C}]\text{Gal}$ intracellulaire libre. La radioactivité retenue sur les membranes filtrantes était ensuite mesurée. La quantité de $[^{14}\text{C}]\text{Gal}$ fixée par la souche 20SOK⁻ (non préinduite) a été reportée sur cette figure à partir des données figurant Tableau 5.

4. Conclusions

Les résultats précédents établissent que la répression permanente qui s'exerce sur la biosynthèse de la galactokinase est levée très efficacement—de façon presque complète, semble-t-il—par le D-fucose. La concentration de cet inducteur, dont la configuration est très voisine de celle du galactose, dépend essentiellement de l'activité de la galactose-perméase. Le fucose n'est pas un substrat de la galactokinase et son affinité pour l'enzyme induite est elle-même remarquablement faible: les hypothèses selon lesquelles la capacité d'un composé à induire serait subordonnée à sa propriété de substrat ou serait fonction de son affinité de complexant pour l'enzyme inductible (Yudkin, 1938; Spiegelman, 1946; Monod, 1949) ne sont donc pas compatibles avec les caractéristiques de l'induction dans ce système. Ce résultat confirme la signification générale des conclusions analogues formulées à la suite de l'étude de l'induction de la β -galactosidase par les thiogalactosides (Monod, Cohen-Bazire & Cohn, 1951; Buttin, 1955) et de la β -glucuronidase par les thioglucuronides (Stoeber, 1961) chez *E. coli*. Il paraît nécessaire pour interpréter les propriétés du fucose et l'effet inhibiteur des thiogalactosides, de postuler l'existence d'un *site cellulaire*—distinct du site enzymatique de la galactokinase et susceptible de reconnaître électivement la configuration moléculaire très précise des inducteurs et des inhibiteurs de l'induction. Ces composés gouvernent le taux de synthèse de l'enzyme sans être métabolisés de façon appréciable: l'élaboration de modèles qui les représenteraient engagés dans des réactions autres qu'une association réversible avec le site

cellulaire spécifiquement impliqué dans le processus de régulation ne semble donc pas justifiée. Les propriétés du TMG, inducteur de la synthèse de β -galactosidase et inhibiteur de la synthèse de galactokinase, montrent d'autre part clairement qu'un même composé peut exercer simultanément, et sans participer au métabolisme général de la cellule, une action opposée au niveau de deux systèmes de régulation indépendants. Le modèle proposé par Monod, Changeux & Jacob (1963) selon lequel le site cellulaire caractéristique de chaque système de régulation et doué d'affinité spécifique pour les inducteurs ne serait pas le site actif d'une protéine enzymatique, mais le *site d'inhibition* "allostérique" d'un *répresseur* protéique rend entièrement compte de ces observations.

Il paraît bien établi d'autre part que l'induction des trois enzymes galactokinase, transférase et épimérase est un processus *simultané*, en ce sens qu'elle peut être réalisée par l'intervention d'un même inducteur "gratuit", et n'est pas suspendue lorsqu'une lésion génétique supprime l'activité de l'une des enzymes de la chaîne métabolique. Nous avons montré en outre que les inducteurs et inhibiteurs de l'induction de ces enzymes agissaient de façon parallèle sur le taux de synthèse de la galactose-perméase. Or les propriétés chimiques des composés exogènes ne paraissent pas modifiées par l'intervention de la perméase: les mutants dépourvus de galactokinase n'accumulent que du galactose libre à partir de galactose exogène (Horecker *et al.*, 1960), et nous avons pu observer qu'une mutation qui supprime l'activité de la galactose-perméase n'abolit pas l'aptitude du fucose ou du galactose à induire, lorsque ces composés sont présents dans le milieu extérieur en quantité suffisante pour que leur concentration intracellulaire soit assurée sans l'intervention de la perméase spécifique. Dans ces conditions, un même effecteur paraît jouir de la propriété d'exercer un effet pléiotrope sur les biosynthèses de galactose-perméase, de galactokinase, de transférase et d'épimérase. Une telle situation est entièrement parallèle à celle qui s'observe dans les systèmes répressibles, tels que la chaîne de biosynthèse de l'arginine, où il est bien établi que cet aminoacide réprime simultanément et non séquentiellement la biosynthèse de sept enzymes fonctionnellement liées (Gorini & Maas, 1957); elle suggère que les effecteurs de régulation de la séquence métabolique du galactose exercent leur effet au niveau d'un *unique* *répresseur*, spécifique de ce système. Nous montrerons que l'étude du déterminisme génétique de la régulation confirme et permet de préciser cette hypothèse.

Ce travail, dont certaines conclusions ont fait l'objet d'une communication préliminaire (Buttin, 1961), a bénéficié du soutien du "Jane Coffin Childs Memorial Fund", du "National Institutes of Health", du Commissariat à l'Energie atomique et de la Délégation générale à la Recherche scientifique.

L'auteur exprime sa profonde gratitude au Professeur J. Monod qui a dirigé ses recherches; il assure de sa sincère reconnaissance A. Képès pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et en particulier pour sa participation personnelle à certaines expériences de perméation.

REFERENCES

- Appleyard, R. K. (1954). *Genetics*, **39**, 429.
Attardi, G., Naono, S., Gros, F., Brenner, S. & Jacob, F. (1962). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **255**, 2303.
Attardi, G., Naono, S., Gros, F., Buttin, G. & Jacob, F. (1963). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **256**, 805.
Buttin, G. (1955). Diplôme Et. sup., Paris.
Buttin, G. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 213.
Buttin, G. (1963). *J. Mol. Biol.* **7**, 183.

- Buttin, G., Jacob, F. & Monod, J. (1960). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **250**, 2471.
- De Robichon-Szulmajster, H. (1958). *Biochim. biophys. Acta*, **29**, 270.
- Epps, H. M. R. & Gale, E. F. (1942). *Biochem. J.* **36**, 6191.
- Gorini, L. & Maas, W. K. (1957). *Biochim. biophys. Acta*, **25**, 208.
- Hayes, W. (1953). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **18**, 75.
- Horecker, B. L., Thomas, J. & Monod, J. (1960). *J. Biol. Chem.* **235**, 1580.
- Horowitz, E. B. (1962). *Analyt. Biochem.* **3**, 498.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961a). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 195.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961b). *J. Mol. Biol.* **3**, 318.
- Jacob, F. & Wollman, E. L. (1956). *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 486.
- Kalckar, H. M., Kurahashi, K. & Jordan, E. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1776.
- King, E. J. (1932). *Biochem. J.* **26**, 292.
- Kurahashi, K. & Sugimura, A. (1960). *J. Biol. Chem.* **235**, 940.
- Kurahashi, K. & Wahba, A. J. (1958). *Biochim. biophys. Acta*, **30**, 298.
- Lederberg, E. L. (1960). In *Microbial Genetics*, p. 115. Cambridge: University Press.
- Leloir, L. F. (1951). *Arch. Biochem. Biophys.* **33**, 186.
- Magasanik, B. (1955). *J. Biol. Chem.* **213**, 557.
- Monod, J. (1942). *Recherches sur la Croissance des Cultures bactériennes*. Paris: Hermann.
- Monod, J. (1949). *Unités biologiques douées de Continuité génétique*, p. 181. Paris: C.N.R.S. édit.
- Monod, J., Changeux, J. P. & Jacob, F. (1963). *J. Mol. Biol.* **6**, 306.
- Monod, J., Cohen-Bazire, G. & Cohn, M. (1951). *Biochim. biophys. Acta*, **7**, 585.
- Monod, J. & Cohn, M. (1952). *Advances Enzymol.* **13**, 67.
- Monod, J., Pappenheimer, A. M. & Cohen-Bazire, G. (1952). *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 648.
- Morse, M. L., Lederberg, E. M. & Lederberg, J. (1956). *Genetics*, **41**, 142 et 758.
- Nikaido, H. (1961). *Biochim. biophys. Acta*, **48**, 460.
- Pollock, M. (1950). *Brit. J. Exp. Pathol.* **4**, 739.
- Sherman, J. R. (1962). Thesis, University of Wisconsin.
- Spiegelman, S. (1946). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **11**, 256.
- Stanier, R. Y. (1951). *Ann. Rev. Microbiol.* **5**, 35.
- Stoeber, F. (1961). Thèse, C.D.U. et S.E.D.E.S. Paris.
- Türk, D. (1955). Thèse, Bonn.
- Van Hofsten, B. (1961). *Biochim. biophys. Acta*, **48**, 159.
- Wiesmayer, H. & Jordan, E. (1961). *Analyt. Biochem.* **2**, 381.
- Yarmolinsky, M. B., Jordan, E. & Wiesmayer, H. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 217.
- Yarmolinsky, M. B. & Wiesmayer, H. (1960). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1786.
- Yarmolinsky, M. B., Wiesmayer, H., Kalckar, H. M. & Jordan, E. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1786.
- Yudkin, J. (1938). *Biol. Rev.* **13**, 93.

Mécanismes Régulateurs dans la Biosynthèse des Enzymes du Métabolisme du Galactose chez *Escherichia coli* K12

II. Le Déterminisme Génétique de la Régulation

G. BUTTIN

Service de Biochimie cellulaire, Institut Pasteur, Paris, France

(Received 10 April 1963)

Galactose metabolism in *E. coli* depends upon the activity of three inducible enzymes (galactokinase, transferase and epimerase); the genes controlling the individual activity of these enzymes constitute the chromosomal *Gal* segment. Mutants have been isolated which synthesize constitutively all three enzymes; three of these mutants have been more carefully investigated. In two cases, the mutation has been found to affect a *regulator gene*. The gene is not linked to the *Gal* segment and it maps near the classical "*lysine*" marker on the linkage group of *E. coli*. On the other hand, another constitutive mutation (*O^ogal*) is cotransducible with the *Gal* segment by λ phage. Recombinational analysis between various *Gal*⁻ mutants reveals that, as expected, the mutations which abolish the same enzymic activity map together. The relative order of the *Gal* genes is: kinase, transferase, epimerase. The *O^ogal* mutation is closely linked to a mutation located in the terminal part of the epimerase gene. The measurement of galactokinase and transferase activities in transduced cells (heterogenetic for the *Gal* genes) clearly indicates that the pleiotropic effect of the *O^ogal* mutation is limited to the structural determinants located in *cis* position. These results appear to identify the *O^ogal* mutation as a *constitutive operator mutation* and the *Gal* segment as a typical *operon*. The conclusion is fortified by the observation that the galactokinase and transferase activities are quantitatively coordinated.

Preliminary results strongly support the view that the biosynthesis of the inducible galactose-permease is controlled by the same *regulator gene*, but that this *regulator gene* acts upon a distinct *operator*.

1. Introduction

Les trois enzymes qui, chez *E. coli*, gouvernent le métabolisme du galactose: galactokinase, galactose-1-phosphate uridylyltransférase (transférase) et uridine-diphosphoglucose 4-épimérase (épimérase), ainsi que la galactose-perméase, peuvent être induites simultanément par un composé non métabolisable (D-fucose). Cette situation, mise en évidence par les expériences de cinétique d'induction qui ont été décrites dans la première partie de cette étude (Buttin, 1963) suggère que l'inducteur commun agit au niveau d'une unique structure cellulaire stéréo-spécifique. Dans le modèle proposé par Jacob & Monod (1961a) pour interpréter la régulation des biosynthèses protéiques, cette hypothèse permet d'envisager qu'un même répresseur gouverne la synthèse des trois enzymes et de la perméase. L'étude du déterminisme génétique de la régulation est favorable à cette interprétation: nous montrerons que les biosynthèses de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase sont simultanément déréprimées par les mutations d'un même gène régulateur, qui élabore

très vraisemblablement le répresseur de ce système. Des observations préliminaires, que nous discuterons, suggèrent que la biosynthèse de la galactose-perméase est également influencée par l'activité de ce gène régulateur.

Les déterminants qui gouvernent individuellement les activités de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase sont liés: il est établi que la plupart des mutations qui suppriment l'aptitude à utiliser le galactose (mutations *Gal*⁻) affectent un court segment chromosomique (*segment Gal*) que transduit électivement le bactériophage λ . La transduction produit des clones diploïdes pour le segment *Gal* et relativement stables (Morse, Lederberg & Lederberg, 1956a,b). Cette propriété a permis de classer les mutants du segment *Gal* en quatre groupes de complémentation fonctionnelle (Lederberg, 1960). La caractérisation biochimique des phénotypes a révélé que trois de ces groupes correspondent respectivement à un défaut d'activité de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase, le quatrième groupe étant composé de mutants défectifs pour l'ensemble des trois activités enzymatiques (Kalckar, Kurahashi & Jordan, 1959; Soffer, 1961).

Des mutations *Gal*⁻ extérieures au segment *Gal* sont connues; il a été découvert récemment qu'un certain nombre d'entre elles concernent l'activité de l'uridine-diphosphoglucosepyrophosphorylase.† Plusieurs de ces mutants présentent également une activité réduite ou nulle de la galactokinase: cette manifestation simultanée de deux lésions biochimiques différentes résulte, selon toute vraisemblance d'une mutation secondaire, sélectionnée en raison de la bactériostase que provoque la perte de l'uridine-diphosphoglucosepyrophosphorylase chez les cellules capables de phosphoryler le galactose, et cultivées en présence de ce sucre (Fukasawa, Jokura & Kurahashi, 1962; Sundararajan, Rapin & Kalckar, 1962). Il paraît donc peu douteux que le segment *Gal* contient l'ensemble de l'information génétique relative à la structure des trois protéines galactokinase, transférase et épimérase. Nous avons étudié une mutation de régulation localisée dans ce segment; nous rapportons ici les résultats de cette étude qui a fourni des indications très suggestives sur les conditions dans lesquelles s'effectue la transcription de l'information contenue dans les déterminants qui constituent cette séquence génétique.

2. Matériel et Méthodes

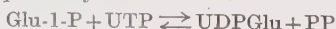
(a) Souches bactériennes

Ces expériences ont mis en œuvre plusieurs souches à haute fréquence de recombinaison (Hfr): Hfr H (Hayes, 1953); Hfr2 et Hfr4 (Jacob & Wollman, 1957), AT13 (Taylor & Adelberg, 1960), AT11A (Reissig & Wollman, résultats non publiés), U127 (Calef & Licciardello, 1960); YA287 (Beckwith, Pardee, Austrian & Jacob, 1962), et des souches de type sexuel F⁻: *Gal*⁻¹⁻² (Weigle, référence dans Arber, 1958), C600Sr, PA503, P678 (Wollman & Jacob, 1957, et résultats non publiés). Les caractères propres à chaque souche et utilisés comme marqueurs génétiques seront précisés ultérieurement, ainsi que le pedigree des clones que nous avons obtenus à partir de l'une ou l'autre d'entre elles par mutation ou par recombinaison génétique.

(b) Milieux et conditions de culture

Cultures en milieux liquides. Les conditions de culture en milieu minéral synthétique 63 ont été décrites précédemment (Buttin, 1963). Les milieux complets suivants ont été

† L'activité de cette enzyme qui catalyse la réaction:



paraît indispensable à la production de la quantité d'UDPGlu nécessaire à l'amorçage de la réaction de transfert.

également utilisés: bouillon de viande (extrait de viande Liebig 5 g; peptone bactériologique 10 g; NaCl 5 g; H₂O q.s.p. 1000, pH 7.4 par NaOH). Milieu L: selon Lennox (1955).

Cultures sur milieux solides. Les souches étaient conservées sur milieu gélosé complet, à l'exception des mutants dépourvus d'épimérase qui ont été constamment cultivés sur milieu minéral synthétique glucosé. La composition de ces milieux, qui étaient utilisés également pour les étalements, est la suivante. Milieu complet: éléments du milieu liquide bouillon (1 l.) incorporés à 20 g de gélose. Milieu synthétique: éléments du milieu 63 (1 l.) incorporés à 15 g de Difco-agar, auxquels étaient ajoutés les sucres et facteurs de croissance désirés. L'identification rapide des clones aptes ou non à utiliser le galactose était effectuée sur milieu indicateur coloré à l'éosine-bleu de méthylène (milieu EMB-galactose).

(c) Détermination des activités enzymatiques

Selon les techniques décrites dans la première partie de cette étude. Pour chaque enzyme, l'unité d'activité adoptée (U) est l'activité qui réalise la conversion de 1 μ M de substrat spécifique (galactokinase: galactose; transférase: galactose-1-phosphate; épimérase: uridinediphosphogalactose) par heure.

(d) Techniques génétiques

Mutagenèse. Le rayonnement ultraviolet et l'acide nitreux (Kaudewitz, 1959) ont été utilisés comme agents mutagènes.

Sélection de mutants auxotrophes. Des mutants présentant des exigences nutritionnelles variées ont été isolés à partir de la souche constitutive B78A par une technique de contresélection à la pénicilline, adaptée de celle de Davis (1948).

Isolément de mutants Gal⁻. Un certain nombre de mutants *Gal⁻* (dépourvus de galactokinase ou de transférase) ont été isolés sans sélection préalable sur milieu indicateur à l'EMB-galactose, à partir de suspensions ayant subi un traitement mutagène. D'autres mutants *Gal⁻* ont été isolés en contresélectionnant la souche parentale pendant sa croissance en milieu galactosé, par addition de pénicilline. Les étalements étaient faits sur milieu minéral glucosé et les répliques simultanément sur milieux minéraux glucosé et galactosé, et sur milieu complet à l'EMB-galactose. Un certain nombre de colonies qui ne se développaient pas sur le milieu galactosé avaient également une croissance presque nulle sur le milieu indicateur, où leur présence ne se manifestait que par une empreinte mauve. Ces clones présentaient tous la propriété (caractéristique des mutants dépourvus d'épimérase) de se lyser lors de leur culture en milieu tryptoné galactosé (Yarnolinsky, Wiesmayer, Kalckar & Jordan, 1959; Fukasawa & Nikaido, 1961). La déficience en épimérase a été vérifiée pour deux d'entre eux par mesure directe de l'activité de cette enzyme.

La présence de galactose (10⁻² M) inhibe complètement la croissance en milieu minéral glycérolé des mutants dépourvus de transférase lorsqu'ils ont conservé une galactokinase active (Kurahashi & Wahba, 1958); cette propriété a été utilisée pour la sélection secondaire de doubles mutants ne manifestant aucune de ces deux activités enzymatiques. Bien que cet effet bactériostatique du galactose soit très réduit en milieu complet, la sélection de doubles mutants, ne manifestant plus l'activité de la galactokinase, a été constatée dans deux cas au moins, à la suite de réisollements de mutants dépourvus de transférase sur milieu indicateur à l'EMB-galactose.

Croisements. Les croisements entre bactéries Hfr (environ 5 × 10⁷ bact./ml.) et F⁻ (10⁸ à 4 × 10⁸ bact./ml.) provenant de cultures en phase exponentielle de croissance étaient effectués en milieu complet à 37°C. Dans les expériences où un dénombrement de recombinants était nécessaire, pour chacune des dilutions choisies, deux prélèvements de 0.1 ml. étaient incorporés chacun à un tube d'agar en surfusion (7 g de Bacto-agar Difco/l.) et le contenu du tube était étalé en nappe sur le milieu sélectif choisi. Chaque souche parentale était étalée isolément sur le même milieu afin de vérifier que sa contresélection était effective.

Isolément de clones hétérologotes. Les lysats du phage λ transduisant à basse fréquence les caractères *Gal⁺* ont été obtenus en induisant par les rayons u.v. (Weigle & Delbrück, 1951) le développement de ce prophage dans des souches sauvages préalablement lysogénisées. Ces lysats ont été utilisés pour la transduction de souches *Gal⁻*. A cette fin, une

goutte de lysat était déposée sur une nappe de bactéries *Gal*⁻ étalées à la surface d'une boîte de Petri contenant du milieu EMB-galactose; les clones *Gal*⁺ qui se développaient—aisément identifiables sur le milieu indicateur coloré—étaient réisolés trois fois selon la technique décrite par Morse *et al.* (1956*a*); leur caractère hétérogénote était vérifié par l'observation que ces colonies *Gal*⁺ ségrégeaient des clones *Gal*⁻. Deux lysats à haute fréquence de transduction (Morse *et al.*, 1956*a*) ont été préparés par irradiation de deux clones hétérogénotes; l'un résultait de la transduction de la souche *Gal*⁻⁽¹¹²⁻²¹⁾ par un lysat de la souche Hfr H (λ); l'autre, de la transduction de la souche *Gal*⁻¹¹⁴ par un lysat de la souche H81-2(λ); dans l'un et l'autre cas, les souches réceptrices et les prophages transducteurs sont homogénotes pour un allèle (*O*⁺*gal* ou *O*^c*gal*) du déterminant transductible *Ogal* (voir texte); toutes les particules transductrices de chaque lysat étaient donc elles-mêmes homogénotes soit pour le caractère *O*⁺*gal*, soit pour le caractère *O*^c*gal*.

Outre la notation classique: souche *X* (λ), désignant une souche lysogénisée par le prophage λ , les notations suivantes seront utilisées: λ *Gal*, particule défective du phage λ , transductrice des caractères *Gal*; souche *X* (λ *Gal*), souche *X* lysogénisée par le prophage λ *Gal*. Nous conviendrons, dans ces expériences, de désigner par cette dernière notation les clones hétérogénotes utilisés qui, résultant d'une transduction effectuée à haute multiplicité d'infection, étaient en réalité doublement lysogènes, de type (λ) (λ *Gal*⁺) (Arber, 1958).

3. Résultats

(a) Isolement et caractérisation de mutants de régulation

Nous avons cherché à créer des conditions expérimentales favorisant la croissance des mutants qui synthétisaient constitutivement l'enzyme ou les enzymes, limitant (s) pour l'utilisation du galactose. Chaque fois que de telles conditions ont été réalisées, il s'est avéré possible d'isoler des mutants synthétisant constitutivement la galactokinase. Comme nous le montrerons, la biosynthèse des autres enzymes spécifiquement impliqués dans le métabolisme de ce sucre était également déreprimée chez ces mutants.

Méthodes permettant l'isolement et l'identification de clones "constitutifs"

(i) *Cultures alternées en milieux glucosé et galactosé.* Cette technique exploite l'avantage que représente la suppression de la latence de "diauxie" introduite dans la croissance des souches inductibles sauvages par le transfert des cellules d'un milieu glucosé à un milieu galactosé (Monod, 1942; Cohen-Bazire & Jolit, 1953). Des mutants constitutifs ont été isolés à partir de diverses souches. Les cultures provenant d'un inoculum soumis à un traitement mutagène étaient diluées matin et soir au 1/40e en milieu synthétique alternativement galactosé ou glucosé. L'activité de la galactokinase dans les suspensions en milieu glucosé était mesurée de dix en dix passages environ. Les cultures dans lesquelles cette activité était largement supérieure à celle d'une culture-témoin en même milieu étaient étalées sur milieu gélosé solide et l'activité de l'enzyme était déterminée dans quelques clones. Appliquée à des souches à haute fréquence de recombinaison, ou à des souches multiplement "marquées" par des exigences nutritionnelles, une telle technique ne permet que très exceptionnellement la perpétuation de ces caractères contre-sélectionnés.

(ii) *Cultures en présence d'un inhibiteur de l'induction.* La propriété (décrite dans la première partie de cette étude) que manifeste le TMG[†] d'inhiber l'induction des

[†] Abréviations: TMG = thiométhyl β -D-galactoside. Les abréviations conventionnelles relatives aux caractères utilisés comme marqueurs génétiques sont rappelées en légende du Tableau 2.

enzymes d'utilisation du galactose, sans être utilisable en tant que source énergétique, a été mise à profit pour l'isolement de mutants constitutifs.

Dans ces expériences, un inoculum de 0.1 ml. d'une suspension de bactéries préalablement exposées à l'acide nitreux naissant était ensemencé dans 10 ml. de milieu minéral galactosé (1 g/l.) contenant du TMG (10^{-2} M) et les facteurs de croissance indispensables; le galactose était renouvelé une ou deux fois après épuisement; la suspension diluée était alors étalée sur milieu gélosé synthétique contenant du galactose (4 g/l.) et du TMG (2×10^{-2} M). Deux types morphologiques de colonies se développent habituellement dans ces conditions: des colonies de taille réduite, correspondant à la fraction inductible de la population et des colonies de taille très nettement supérieure chez lesquelles la détermination directe de l'activité de la galactokinase a régulièrement révélé une synthèse constitutive de cette enzyme.

(iii) *Test physiologique de discrimination entre colonies inductibles et constitutives.* L'observation d'une différence morphologique entre les colonies formées par les cellules inductibles et celles qui correspondaient aux mutants constitutifs a suggéré qu'un test simple de croissance sur milieu solide pourrait, moyennant certaines précautions, aider à suivre la ségrégation du gène muté au cours de croisements entre souches sauvages et constitutives. Ceci suppose que la signification du test ne soit pas altérée lorsque tous les recombinants d'un même croisement ne sont pas isogéniques pour certains caractères utilisés comme "marqueurs". Comme on peut le prévoir, la présence des "marqueurs" correspondant à des exigences nutritionnelles (satisfaites par l'adjonction au milieu des facteurs de croissance correspondants) n'affecte pratiquement pas l'inhibition par le TMG des souches inductibles. Par contre le défaut d'activité de la β -galactoside-perméase (symbole génétique: y^-) est susceptible de brouiller les résultats du test physiologique de croissance: il est apparu en effet que le TMG inhibe la croissance d'une classe de recombinants constitutifs (correspondant à la mutation *O^cgal*) lorsqu'ils sont de caractère y^- . Ce phénomène sera discuté au paragraphe (d), Déterminisme génétique de la biosynthèse de galactose-perméase. Pour cette raison, les recombinants soumis au test de croissance étaient en général de caractère y^+ , soit parce que les souches parentales étaient isogéniques pour ce caractère, soit parce que la sélection choisie éliminait les recombinants y^- . La validité du test de croissance était constamment vérifiée par la détermination directe de l'activité de la galactokinase dans une fraction des colonies. L'incorporation de TMG 2×10^{-2} M à un milieu galactosé (4 g/l.) a permis une discrimination sans ambiguïté entre recombinants inductibles et constitutifs. Les colonies testées étaient repiquées, à partir d'un milieu glucosé, assurant la répression maximale des enzymes inductibles, sur un milieu de cette composition et, à titre de témoin sur le même milieu galactosé, ne contenant pas de TMG. La croissance était comparée après 20 heures d'incubation à 37°C. Dans ces conditions, la croissance sur milieu "TMG-galactose" des colonies inductibles, pourvues ou non de β -galactoside-perméase, est très réduite alors que la croissance des colonies constitutives y^+ est équivalente ou supérieure à celle que manifestent ces cellules sur le milieu galactosé.

Propriétés communes aux souches constitutives étudiées (B78 A, 112-1, H81-2)

(i) Les mutants de régulation que nous avons isolés ont tous été caractérisés initialement par une activité basale élevée de la galactokinase. Les synthèses de transférase et d'épimérase sont également dérégulées dans ces cellules: chaque fois qu'elles ont été déterminées, chez des mutants sélectionnés par l'une ou l'autre des

techniques précédemment décrites, les activités de la transférase et de l'épimérase sont apparues de 10 à 25 fois plus élevées que chez la souche inductible parentale, ce qui représente un accroissement d'activité semblable à celui de la galactokinase elle-même.

(ii) L'adjonction d'inducteur n'élève que faiblement le taux de synthèse de la galactokinase chez ces mutants. Au terme de plusieurs doublements effectués en sa présence, l'inducteur le plus efficace (D-fucose) accroît l'activité de l'enzyme de 20% à 40% selon la souche constitutive (Tableau 1). Chez aucun des 7 mutants

TABLEAU 1

Activité des enzymes du métabolisme du galactose chez une souche inductible (Hfr H) et chez différents mutants constitutifs

Souche	Parent	Activité galactokinase† (U/mg)			Activité† transférase (U/mg)	Activité† épimérase (U/mg)
		Glycérol	+ Fucose (10 ⁻³ M)	+ TMG (2 × 10 ⁻³ M)	Glycérol	Glycérol
Hfr H	—	0.9	13.6	—	0.6	5.8
H81-2	Hfr H	19.0	22.0	14.0	12.2	90.0
B78A	C600Sr	12.6	16.4	10.5	9.2	48.0
112-1	AT13	7.8	13.2	7.0	5.9	—

† Activités de suspensions en croissance en milieu minéral au glycérol (*Glycérol*). L'inducteur (D-fucose) et l'inhibiteur de l'induction (TMG) étaient présents pendant au moins 5 doublements précédant le prélèvement.

constitutifs que nous avons étudiés de ce point de vue, l'activité maximale de la galactokinase n'était plus de 30 fois supérieure à l'activité de base de la souche parentale.

(iii) La synthèse de galactokinase, chez les mutants constitutifs, présente une sensibilité très réduite à l'égard des inhibiteurs de l'induction. Cette propriété, vérifiée par les déterminations d'activité de la galactokinase effectuées dans des cellules précultivées en présence de TMG (Tableau 1), est évidemment prévisible dans le cas des souches constitutives H81-2 et 112-1 qui ont été isolées en présence de ce composé. Elle se révèle commune aux différentes souches isolées par la technique des cultures alternées, dont la croissance s'effectue normalement sur milieu "TMG-galactose" dans les conditions précédemment décrites.

Les propriétés physiologiques qui ont permis la sélection de ces diverses souches traduisent donc l'aptitude à synthétiser constitutivement les trois enzymes galactokinase, transférase et épimérase. La localisation des mutations correspondantes révèle que ce phénotype commun peut résulter d'une altération génétique au niveau de l'un ou de l'autre de deux loci chromosomiques distincts.

(b) Localisation et caractérisation d'un gène régulateur extérieur au segment Gal

Les mutations qui rendent constitutives les souches F- B78 A et Hfr112-1 concernent un gène à effet régulateur pléiotrope, distinct des déterminants structuraux des trois enzymes. Ce déterminant que nous noterons *Rgal* a été localisé sur le chromosome bactérien.

(i) *Analyse des produits des croisements entre bactéries F^- constitutives et bactéries Hfr portant l'allèle sauvage du gène régulateur.*

(a) Nous avons isolé un mutant (B106-1) dépourvu de galactokinase (K^-) à partir de la souche constitutive streptomycino-résistante (Sm^r) F^- B78 A. La localisation de la mutation K^- au niveau du segment *Gal* a été vérifiée par l'aptitude que présente la souche B106-1 à être complémentée pour l'utilisation du galactose par les particules transductrices d'un lysat du phage λ , issus d'une souche lysogène sauvage Gal^+ (particules λGal^+). Ce mutant a été croisé avec la souche Hfr H, streptomycinosensible (Sm^s). Le déterminant K^+ du parent inductible est transféré à haute fréquence dans ce croisement. L'activité de la galactokinase a été mesurée chez six recombinants $K^+ Sm^r$ ayant reçu le caractère K^+ de la souche parentale inductible: tous synthétisaient constitutivement cette enzyme. Ce résultat suffit à exclure la possibilité d'une liaison étroite entre les déterminants du segment *Gal* et le gène *Rgal*.

(b) La ségrégation du caractère *Rgal* a été suivie au cours de plusieurs séries de croisements réalisées entre différentes souches Hfr R^+gal , capables chacune de transférer à haute fréquence un segment particulier du matériel génétique (Fig. 1),

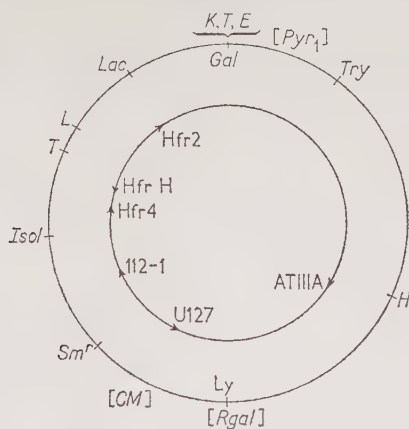


FIG. 1. Représentation schématique du "chromosome" d'*E. coli* K12 (d'après Jacob & Wollman, 1961). Les flèches indiquent la polarité du transfert ainsi que l'origine des segments génétiques transférés par les différentes souches Hfr. Abréviations: K = galactokinase; T = transférase; E = épimérase. Autres abréviations: voir légende du Tableau 2.

et des souches R^-gal de type sexuel F^- , toutes issues de B78 A et caractérisées par des exigences nutritionnelles différentes (voir Matériel et Méthodes), correspondant elles-mêmes à des mutations localisées en des points variés du chromosome d'*E. coli*. Au terme des croisements, les bactéries étaient étalées sur un milieu synthétique gélifié de composition telle que soient sélectionnés les seuls recombinants ayant reçu du mâle un caractère déterminé. Si, à l'occasion d'une des sélections opérées, l'allèle R^+gal est très fortement lié au caractère sélectionné transmis par le parent Hfr, il sera lui-même transféré à la quasi-totalité des recombinants; il ne sera au contraire transféré qu'à une fréquence moyenne si sa liaison est faible, et pratiquement jamais si le déterminant qui lui correspond est localisé sur un segment du chromosome qui n'est lui-même transmis qu'exceptionnellement par cette souche Hfr. La mise en

TABLEAU 2
Croisements entre souches Hfr R⁺gal et F⁻ R⁻gal

Hfr R ⁺ gal	F ⁻ R ⁻ gal†	Milieu sélectif‡	Caractères sélectionnés		Durée du croisement (min)	Recombinants		% de recombinants R ⁺ gal
			Hfr	F ⁻		Etudiés	R ⁺ gal	
Hfr4 (T ⁻ L ⁻ Lac ⁻¹ Sm ^s)§	179-17 (λ) (Ly Sm ^r)	LacSm	Ly ⁺			64	63	> 98
	179-23 (λ) (H ⁻ Sm ^r)		H ⁺			64	9	14
	179-58 (λ)¶ (CM ⁻ Sm ^r)		CM ⁺	Lac ⁺ T ⁺ L ⁺ Sm ^r	110	34	42	66
	176-66 (λ) (Isol ⁻ Sm ^r)		Isol ⁺			64	1	< 2
	B78 A-66 (Isol ⁻ L ⁻ Lac ⁻¹ Sm ^r)		Isol ⁺	P ⁺	50	60	0	< 2
U127 (P ⁻) AT11A	B78 A-23 (H ⁻ L ⁻ Lac ⁻¹ Sm ^r)	GLSm	H ⁺	Sm ^r	90	62	0	< 2
	B78 A (λ) (Lac ⁻¹ L ⁻ Sm ^r)	GMSm	L ⁺	Sm ^r	80	60	0	< 2
Hfr2 (M ⁻)	B170 A (λ) (Lac ⁻¹ L ⁻ Gal ⁻¹ Sm ^r)	GalSmTLM	Gal ⁺	Sm ^r	120	62	3	5
Hfr H	B78 A (Lac ⁻¹ L ⁻ Sm ^r)	GSm	L ⁺	Sm ^r	65	152	0	< 1

† Les souches B78 A-66, B78 A-23 sont des mutants auxotrophes de la souche B78 A (R⁻gal L⁻ Lac⁻¹ Sm^r). Les souches de la série 179 (179-66, 179-23, 179-17, 179-58) sont des recombinants L⁺ Lac⁺ Sm^r issus de croisements entre Hfr H et les mutants auxotrophes de la série précédente. Ces souches ont été lysogénisées par le prophage λ afin que leur croisement avec des Hfr lysogènes ne provoque pas d'induction zygotique (Wollman & Jacob, 1957). La souche B170 A est un double mutant K⁻ T⁻ isolé en deux étapes à partir de B78 A.

‡ De la thiamine, indispensable à la croissance des souches utilisées, était incorporée systématiquement à tous les milieux synthétiques.

§ Le marqueur Lac⁻¹ correspond au caractère y⁻.

|| Abréviations: T⁺ = thréonine; L⁺ = leucine; M⁻ = méthionine; Ly = lysine; H = histidine; CM = cystéine ou méthionine; Isol = isoleucine; P = proline; Arg = arginine; Trp = tryptophane; Pyr = pyrimidines; G = glucose; Gal = galactose; Lac = lactose; Sm = streptomycine. Dans la définition du génotype d'une souche les mêmes abréviations désignent l'aptitude (+) ou l'inaptitude (-) à synthétiser le métabolite ou à utiliser le sucre correspondant. La sensibilité et la résistance à la streptomycine sont notées respectivement: Sm^s et Sm^r. Dans les milieux sélectifs, les aminoacides étaient incorporés à raison de 0.1 g/l, les sucres à raison de 6 g/l, et la streptomycine à raison de 0.5 g/l de sulfate de streptomycine.

¶ La localisation du marqueur CM est incertaine.

évidence d'une forte liaison entre l'allèle $R^{+}gal$ et l'un des "marqueurs" utilisés dans ces sélections peut donc conduire à la localisation du déterminant $Rgal$ sur le chromosome bactérien.

Les résultats (Tableau 2) les plus significatifs sont ceux qu'a fourni le croisement entre Hfr4, de génotype $Lac^{-1}T^{-}L^{-}R^{+}gal\ Ly^{+}Sm^{s}$ et la souche F⁻ 179-17 (λ) de génotype $Lac^{+}T^{+}L^{+}R^{-}gal\ Ly^{-}Sm^{r}$. Les recombinants étaient sélectionnés par leur aptitude à se développer sur milieu lactosé en présence de streptomycine. Sur 60 recombinants ayant le caractère Ly^{+} , 59 étaient inductibles. Il existe donc une liaison très forte entre le déterminant $Rgal$ et le locus Ly . La localisation du gène $Rgal$ sur cette partie du chromosome bactérien est confirmée par les résultats négatifs concordants des divers croisements mettant en œuvre soit ce même Hfr et des souches F⁻ différemment marquées, soit d'autres souches Hfr.

(ii) *Identité du déterminant muté chez les souches B78 A et 112-1*

Les mutations qui dérèpriment la synthèse des trois enzymes chez les souches B78A et 112-1 affectent le même déterminant génétique $Rgal$. Cette conclusion paraît imposée par le résultat des expériences suivantes.

TABLEAU 3

Croisements entre Hfr 112-1 et souches F⁻ R⁻gal et F⁻ R⁺gal

Souche F ⁻ †	Génotype	Milieu sélectif	Caractères sélectionnés†		Recombinants		% constitutifs
			Hfr	F ⁻	Etudiés	Constitutifs	
179-23 (λ)	$H^{-}Sm^{r}R^{-}gal$	<i>GalSm</i>	H^{+}	$T^{+}L^{+}$	62	62	100
179-17 (λ)	$Ly^{-}Sm^{r}R^{-}gal$	<i>GalSm</i>	Ly^{+}	$T^{+}L^{+}$	62	62	100
82-A	$Arg^{-2}Ly^{-}H^{-}Sm^{r}(\lambda)R^{+}gal$	<i>LacSmArgH</i>	Ly^{+}	$T^{+}L^{+}Lac^{+}$	60	60	100
82-A		<i>LacSmArgLy</i>	H^{+}	$T^{+}L^{+}Lac^{+}$	56	22‡	39

† La souche Hfr 112-1 est un mutant constitutif isolé sur AT13 de génotype $T^{-}L^{-}Lac^{-1}Sm^{r}(\lambda)$. La souche 82-A est un recombinant $P^{+}Gal^{-}Arg^{-2}Ly^{-}H^{-}Sm^{r}$ issu du croisement de Hfr H avec F⁻ PA503 ($P^{-}Gal^{-b}Arg^{-2}Ly^{-}H^{-}Sm^{r}$). L'origine des souches 179-23 (λ) et 179-17 (λ) est décrite en légende du Tableau 2.

‡ Les 22 recombinants constitutifs se dénombraient tous parmi les 25 recombinants (sur 56) ayant reçu simultanément le caractère Ly^{+} .

(a) Si l'on transfère le déterminant correspondant au caractère Ly^{+} de la souche constitutive Hfr112-1 à la souche constitutive F⁻ 179-17 (λ) de génotype $Ly^{-}R^{-}gal$, les recombinants sélectionnés pour le caractère Ly^{-} sont tous de type constitutif (Tableau 3). Or, comme nous venons de le montrer, en raison de la liaison des déterminants $Rgal$ et Ly , la sélection du caractère Ly^{+} s'accompagne presque toujours de la substitution de l'allèle $Rgal$ porté par le parent Hfr à l'allèle $R^{-}gal$ de la souche receptrice; si la mutation constitutive affectait chez 112-1 un déterminant $rgal$ ayant une localisation différente de $Rgal$ (génotype de 112-1: $r^{-}gal\ R^{+}gal$; génotype de 179-17 (λ): $r^{+}gal\ R^{-}gal$) on devrait observer une ségrégation du caractère $r^{-}gal$ parmi les recombinants de ce croisement qui seraient presque tous soit de génotype $r^{-}gal\ R^{+}gal\ Ly^{+}$, soit de génotype $r^{+}gal\ R^{+}gal\ Ly^{+}$. Des recombinants $r^{+}gal\ R^{-}gal\ Ly^{+}$ ayant le génotype sauvage devraient être décelés comme clones inductibles. Le fait

que cette situation ne s'observe pas suggère que les déterminants *rgal* et *Rgal* sont identiques.

(b) Le degré de liaison entre le déterminant *rgal* muté chez la souche 112-1 et le marqueur *Ly* peut être estimé directement en effectuant le croisement: Hfr *r⁻gal Ly⁺* × F⁻ *r⁺gal Ly⁻*, inverse de celui qui a permis la localisation de *Rgal* chez la souche B78A (Hfr *R⁺gal Ly⁺* × F⁻ *R⁻gal Ly⁻*). Cette expérience a été réalisée en utilisant une souche F⁻ inductible de génotype *Arg⁻² H⁻ Ly⁻*. Les résultats rapportés dans le Tableau 3 indiquent que le déterminant dont la mutation rend la souche 112-1 constitutive est aussi lié au marqueur *Ly* que l'était le déterminant *Rgal* précédemment défini. Il est donc peu douteux que les mutations caractérisant les souches B78A et 112-1 affectent un même gène.

Ce gène distinct des déterminants qui gouvernent la structure des trois enzymes assurant la conversion du galactose a cependant un effet régulateur spécifique et simultané sur la biosynthèse de ces protéines. Son action suppose une médiation extrachromosomique:

(a) Elle réprime dans les cellules sauvages l'expression de déterminants structuraux qui ne sont pas contigus à ce gène.

(b) Dans des cellules partiellement diploïdes, elle est efficace sur des déterminants appartenant à la structure chromosomique située en position "*trans*", comme le montrent les résultats rapportés dans le Tableau 4. Dans l'expérience correspondante,

TABLEAU 4

Expression du gène K⁺ issu d'une souche inductible dans des bactéries hétérogénètes R⁺gal (B34-5) et R⁻gal (B106-1)

Souche	Activité galactokinase (U/mg)		Taux d'induction
	Non induit	Induit (Fucose 10 ⁻³ M)	
B34-5 (<i>λGal⁺</i>)	1.0	14.0	14.0
B106-1 (<i>λGal⁺</i>)	8.0	11.2	1.4

les déterminants *Gal* issus d'une souche sauvage inductible ont été transduits simultanément chez un mutant K⁻ (B106-1) de la souche constitutive B78A et chez un mutant K⁻ isolé à partir d'une souche inductible (B34-5). Il est clair que l'expression du déterminant K actif—intégré dans le génome viral, comme en témoignait la ségrégation de cellules *Gal⁻* par l'un et l'autre clone hétérogénète—est quantitativement gouvernée par la nature de l'allèle *Rgal* présent dans la souche réceptrice.

La situation ainsi mise en évidence suggère très fortement que le gène *Rgal* est le "gène régulateur"—au sens de Jacob & Monod (1961a)—dont l'allèle sauvage élabore le répresseur cytoplasmique spécifique qui gouverne la transcription de l'information contenue dans les déterminants constituant le segment *Gal*. Les propriétés reconnues ne permettent pas, il est vrai, d'exclure formellement l'hypothèse opposée selon laquelle ce gène déterminerait la biosynthèse d'une enzyme qui inactiverait un composé endogène doué de propriétés inductrices; l'inducteur interne s'accumulerait chez les mutants constitutifs. Toutefois cette hypothèse paraît très peu probable: lorsqu'un phénomène d'induction interne a été clairement mis en évidence chez certains mutants d'utilisation du galactose (mutants dépourvus de galactokinase) l'effet de cet inducteur, comme on devait s'y attendre, était annulé par l'addition

un inhibiteur spécifique de l'induction (Yarmolinsky, Jordan & Wiesmayer, 1961). Le fait que ce même inhibiteur (TMG) soit sans action chez les souches *R⁻gal* permet de penser que, chez ces mutants, la dérépression des synthèses enzymatiques ne résulte pas d'une induction interne mais plus probablement d'une altération dans la structure d'un répresseur spécifique.

(c) *L'opéron "Galactose"*

(i) *Mise en évidence d'un opérateur de régulation spécifique du segment Gal*

La mutation constitutive définissant la souche Hfr H81-2 est distincte par certaines de ses propriétés comme par sa localisation des mutations constitutives précédentes.

TABLEAU 5

Phénotype enzymatique de divers mutants Gal⁻

Mutant	Parent	Activités enzymatiques† (U/mg)					
		Galactokinase		Transférase		Epimérase	
		Non induit	Induit	Non induit	Induit	Non induit	Induit
Hfr114	Hfr H81-2	<0.05	<0.05	13.4	12.0	95	—‡
Hfr122-B		22.5	—	<0.1	<0.1	94	—
Hfr138-1	Hfr H	<0.1	<0.1	6.5	6.9	—	+
Hfr112-19		<0.05	<0.05	0.7	7.3	—	+
Hfr138-10		0.6	9.3	<0.1	<0.2	6	67
Hfr112-21		—	8.8	<0.1	<0.1	—	+
Hfr PL2		0.7	11.6	0.4	5.8	—	<1
Hfr PL5		—	6.2	—	8.0	—	<1

† Activités de suspensions en croissance en milieu au glycérol; inducteur éventuel: D-fucose ($\times 10^{-4}$ M à 10^{-3} M).

‡ Non mesuré: le signe + dans la colonne *activité de l'epimérase* indique que les souches correspondantes sont complémentables, pour l'utilisation du galactose, par les particules λ Gal⁻ issues de la souche lysogène PL2 (λ), dépourvue de l'activité de l'epimérase.

(a) Cette mutation, que nous noterons *O^cgal* (la désignation sera justifiée ultérieurement), affecte un déterminant du segment *Gal*: lorsqu'on sélectionne les recombinants possédant les caractères *Gal⁺Sm^r* issus d'un croisement entre la souche constitutive Hfr H81-2 de génotype *Gal⁺O^cgal Sm^s* et la souche inductible *Gal⁻Gal⁻¹⁻²Sm^r* de génotype *Gal⁻(K⁻T⁻) O^cgal Sm^r*, ceux-ci sont invariablement constitutifs (30/30 colonies analysées pour ce caractère).

La souche H81-2 a été lysogénisée par le prophage λ et un lysat préparé à partir du clone constitutif H81-2 (λ) a été utilisé pour transduire divers mutants (*Gal⁻Gal⁻¹⁻²Sm^r*, 112-19): la galactokinase est synthétisée constitutivement dans les souches hétérogénètes. La mutation est donc cotransductible avec le caractère *K⁺* par le phage λ et elle est dominante. Les expériences suivantes précisent cette notion.

(i) Plusieurs mutants *K⁻* et *T⁻* ont été isolés à partir de cette souche: celles des enzymes dont l'activité n'est pas spécifiquement supprimée par ces mutations demeurent constitutives (Tableau 5).

La transduction de ces mutants, et des mutants *Gal*⁻ isolés à partir de la souche inductible parentale Hfr H (Tableau 5), par des particules transductrices $\lambda Gal^{+}O^{+}gal$ et $\lambda Gal^{+}O^{c}gal$ permet d'analyser les relations de dominance entre la mutation *O*^c*gal* et son allèle sauvage *O*⁺*gal*. Les activités de la galactokinase et de la transférase ont été mesurées dans des clones hétérogénètes réalisant des combinaisons génétiques variées, cultivés en présence et en absence d'inducteur (Tableau 6).

TABLEAU 6

Activité de la galactokinase et de la transférase chez divers clones haploïdes et hétérogénètes

Souches§	Génotype	Galactokinase†			Transférase†‡		
		Activité (U/mg)		Taux d'induction	Activité (U/mg)		Taux d'induction
		Non induit	Induit		Non induit	Induit	
Hfr H	<i>K</i> ⁺ <i>T</i> ⁺ <i>O</i> ⁺	0.9	13.6	15.0	0.6	9.7	16.0
H81-2	<i>K</i> ⁺ <i>T</i> ⁺ <i>O</i> ^c	21.7	25.0	1.1	14.7	—	—
112-19	<i>K</i> ⁻ <i>T</i> ⁺ <i>O</i> ⁺	< 0.05	< 0.05	—	0.7	7.3	10.0
114	<i>K</i> ⁻ <i>T</i> ⁺ <i>O</i> ^c	< 0.05	< 0.05	—	13.4	12.0	0.9
122-B	<i>K</i> ⁺ <i>T</i> ⁻ <i>O</i> ^c	22.5	—	—	< 0.1	< 0.1	—
112-19 ($\lambda Gal^{+}O^{c}$)	<i>K</i> ⁺ <i>T</i> ⁺ <i>O</i> ^c <i>K</i> ⁻ <i>T</i> ⁺ <i>O</i> ⁺	22.4	21.0	0.9	9.4	23.5	2.5
122-B ($\lambda Gal^{+}O^{+}$)	<i>K</i> ⁺ <i>T</i> ⁺ <i>O</i> ⁺ <i>K</i> ⁺ <i>T</i> ⁻ <i>O</i> ^c	19.8	26.5	1.3	0.4	5.9	15.0
114 ($\lambda Gal^{+}O^{+}$)	<i>K</i> ⁺ <i>T</i> ⁺ <i>O</i> ⁺ <i>K</i> ⁻ <i>T</i> ⁺ <i>O</i> ^c	1.9	17.0	9.0	16.0	20.4	1.3

† Activités de suspensions en croissance en milieu au glycérol; les cultures induites ont effectué plus de 5 doublements en présence de D-fucose 10^{-3} M. Les activités ont été mesurées après extraction par traitement sonique. Pour les clones diploïdes, elles sont exprimées en U/mg de bactéries de phénotype *Gal*⁺ (les bactéries *Gal*⁻ ségréguées, généralement peu nombreuses, étaient dénombrées sur milieu EMB-galactose).

‡ Les valeurs absolues de l'activité de cette enzyme, rapportées dans une précédente publication étaient plus faibles en raison des conditions différentes du dosage (extraction, concentration des substrats).

§ En ce qui concerne les clones hétérogénètes, des déterminations analogues d'activité ont été faites chez 4 clones de chaque génotype avec des résultats semblables, à l'exception d'un clone 122-B ($\lambda Gal^{+}O^{+}gal$) chez qui la galactokinase a été trouvée entièrement inductible, et qui représente selon tout vraisemblance un recombinant homogénète pour le caractère *O*⁺*gal*.

Les déterminants *K*⁺ et *T*⁺ appartenant à une structure chromosomique affectée par la mutation *O*^c*gal* s'expriment constitutivement (exemple: déterminant *K* clone 122-B ($\lambda Gal^{+}O^{+}gal$)). Cette propriété, comme cela a déjà été mentionné concerne les déterminants *Gal* intégrés dans le génome phagique au même titre que les déterminants *Gal* appartenant au génome de la souche réceptrice (exemple déterminant *K*, clone 112-19 ($\lambda Gal^{+}O^{c}gal$)).

L'expression complète des déterminants *K*⁺ et *T*⁺ qui appartiennent à une structure génétique ayant conservé l'allèle *O*⁺*gal* ne s'observe que sous l'effet d'un inducteur. Ceci apparaît nettement chaque fois que le déterminant homologue en liaison structurale avec l'allèle *O*^c*gal* est défectif.

L'effet dominant de la mutation *O^cgal* est donc restreint à l'expression des déterminants situés en position "cis" par rapport à celui qu'elle affecte. Elle n'exige de ce fait, semble-t-il, aucune médiation extrachromosomique. L'expression des gènes *gal* appartenant à la même structure chromosomique est entièrement déréprimée dans des complexes génétiques où la présence du répresseur spécifique demeure perceptible; de tels effets ne paraissent imputables qu'à la mutation d'un "opérateur de régulation" commun aux déterminants structuraux des trois protéines. Cette interprétation suppose évidemment que les propriétés caractéristiques des mutants *O^cgal* résultent d'une mutation unique. Il était très peu probable à priori que la technique de sélection utilisée ait permis l'isolement d'un clone ayant accumulé successivement trois mutations indépendantes, alors que, vraisemblablement, seule une activité constitutive de l'ensemble de la chaîne conférerait à un mutant un avantage physiologique important; cette interprétation a été vérifiée directement par la localisation de la mutation *O^cgal* par rapport aux déterminants du segment *Gal*.

i) Analyse génétique du segment *Gal*

Cette localisation a été possible au terme de l'étude de la ségrégation du caractère *O^cgal* parmi les recombinants *Gal*⁺ issus de croisements qui mettaient en œuvre ceux à deux, divers mutants *Gal*⁻ portant l'un la mutation *O^cgal*, l'autre l'allèle inducible *O⁺gal*. L'ordre relatif des gènes de structure *K*, *T* et *E* a été au préalable établi; dans ce but, des mutants *Gal*⁻*O⁺gal* appartenant aux trois types structuraux ont été croisés entre eux: la confrontation des fréquences de recombinaison restaurant le phénotype *Gal*⁺, dénombrées au cours de ces croisements, a permis de construire une carte génétique très élémentaire du segment *Gal*.

(a) *Localisation des déterminants K, T, E.* Les mutants ont été isolés sur Hfr H. Leur phénotype biochimique était déterminé par mesure des activités enzymatiques (Tableau 5). Les souches F⁻ *Gal*⁻ étaient marquées par les caractères *Pyr*₁⁻ et *Sm*^r. Le déterminant *Pyr*₁ (gouvernant l'aptitude à synthétiser les bases pyrimidiques) est voisin de *Gal* et distal par rapport à celui-ci pour l'ordre de transfert génétique propre à l'Hfr H. Les souches F⁻ de génotype *Gal*⁻*Pyr*₁⁻*Sm*^r étaient obtenues à la suite du croisement de chaque mutant *Gal*⁻ avec une souche (D140-1†) de génotype *Gal*⁺*Pyr*₁⁻*Sm*^r. La disjonction des caractères *Pyr*₁ et *Gal*, et la ségrégation en tant que cellules isolées des recombinants portant les caractères négatifs *Pyr*₁⁻*Gal*⁻ étaient obtenues en interrompant les croisements après 30 minutes de contact par dilution au 1/50e dans le même milieu, et en laissant se poursuivre les divisions pendant 120 minutes. Les bactéries étaient étalées sur milieu indicateur à l'EMB-galactose, additionné de streptomycine; un certain nombre de recombinants *Gal*⁻*Sm*^r étaient alors testés par répliques pour le caractère *Pyr*₁⁻. Les bactéries dépourvues d'épimérase ne se développant pas sur le milieu indicateur, les produits des croisements mettant en œuvre ces mutants étaient étalés sur milieu glucosé additionné d'uracile et de streptomycine, et les caractères *Gal*⁻ et *Pyr*₁⁻ étaient testés par répliques simultanées d'un nombre suffisant de colonies sur milieu galactosé contenant de l'uracile et sur milieu glucosé dépourvu de ce facteur.

† La souche D140-1 avait été sélectionnée après croisement de l'Hfr YA287 avec la souche C600Sr (*T*⁺*L*⁻*Lac*⁻¹*Pyr*₁⁺*Sm*^r) en tant que recombinant *T*⁺*L*⁺*Lac*⁺*Pyr*₁⁻*Sm*^r. La souche Hfr H étant de caractère *Lac*⁺, les souches Hfr *Gal*⁻ et F⁻ *Gal*⁻ étaient isogéniques pour les allèles sauvages des déterminants *Lac*, donc pour le caractère *y*⁺.

Les croisements entre souches Gal^- étaient poursuivis pendant 65 minutes—milieu L. Le nombre de cellules Hfr et F^- mises en œuvre était comparable. Au terme du croisement, les cellules étaient diluées à 0°C en milieu synthétique et étalées simultanément sur milieux solides synthétiques glucosé et galactosé contenant de la streptomycine. Les recombinants étaient dénombrés après 48 heures d'incubation à 37°C.

La fréquence des recombinaisons restaurant le caractère Gal^+ a été déterminée pour chaque croisement dans la classe des recombinants $Pyr_1^- Sm^r$ (recombinants $Gal^+ Pyr_1^+ Sm^r$); de ce fait se trouve annulée (Jacob & Wollman, 1961) l'influence qu'aurait pu avoir la polarité du transfert de matériel génétique sur la fréquence de transmission des différents déterminants Gal puisque la manifestation du caractère Pyr_1^+ implique le transfert préalable de l'ensemble du segment Gal par Hfr H. Les recombinants $Gal^+ Pyr_1^+ Sm^r$ représentent eux-mêmes une fraction des recombinants $Pyr_1^+ Sm^r$ issus du même croisement (recombinants dénombrés sur milieu glucosé). Des facteurs particuliers à chaque croisement, tels que le nombre des cellules des deux types sexuels mises en présence, affectent de façon semblable le rendement d'un croisement en recombinants de l'une et l'autre classe. L'influence de ces facteurs sera donc éliminée si l'on exprime le nombre des recombinants $Gal^+ Pyr_1^+ Sm^r$ par rapport à celui des recombinants $Pyr_1^+ Sm^r$. Il paraît alors permis de considérer que la valeur du rapport *nombre de recombinants $Gal^+ Pyr_1^+ Sm^r$ rapporté au nombre de recombinants $Pyr_1^+ Sm^r$* , caractéristique de chaque croisement entre deux mutants distincts Gal^{-x} et Gal^{-y} , traduit essentiellement la probabilité qu'ont ces portions de génome de recombiner pour restaurer le génotype sauvage, et par conséquent mesure en première approximation la distance relative séparant les sites mutés. Les valeurs de ce rapport ($\times 10^3$) correspondant à des croisements entre 6 mutants $Gal-O^+gal$ ont été rapportés (Fig. 2).

Les résultats sont compatibles avec une disposition linéaire des sites mutés correspondant au seul ordre suivant: 138-1(K^-), 112-19(K^-), 138-10(T^-), 112-21(T^-), 122-B(T^-), PL5(E^-), PL2(E^-).

Les mutations affectant l'activité d'une même enzyme apparaissent groupées, comme on doit le prévoir si un déterminant distinct contient l'information structurale propre à chaque enzyme. L'ordre relatif de ces déterminants est:

kinase, transférase, épimérase

Si l'on compare la fréquence des recombinants Gal^+ issus des deux croisements possibles entre deux mutants Gal^{-x} et Gal^{-y} (Hfr $Gal^{-x} \times F^- Gal^{-y}$ et Hfr $Gal^{-y} \times F^- Gal^{-x}$) on observe que, d'une façon très générale, le nombre des recombinants est sensiblement plus faible dans le croisement Hfr $Gal^{-x} \times F^- Gal^{-y}$ que dans le croisement inverse, lorsque la mutation Gal^{-x} est située "à droite" de Gal^{-y} dans la représentation adoptée (Fig. 2).

Ceci suggère que, lorsque cette situation est réalisée, la mutation Gal^{-x} est plus proche du marqueur voisin Pyr_1 que la mutation Gal^{-y} : le fait qu'une recombinaison supplémentaire soit alors indispensable entre Gal^{-x} et Pyr_1 pour réaliser le génotype $Gal^+ Pyr_1^+$ est en effet susceptible de rendre compte de l'élimination d'un certain nombre de recombinants. L'ordre absolu des déterminants sur le chromosome bactérien paraît donc être: *kinase, transférase épimérase, ... Pyr_1 , ... Sm^r* .

(b) *Localisation de la mutation O^+gal* . Les mutants $Gal-O^+gal$ ont été isolés sur Hfr H81-2 et les mutations correspondantes transférées dans la souche F^- D140-1

suivant la technique précédemment décrite. Il n'a pas été observé de cas de ségrégation du caractère $O^c gal$ par rapport au caractère Gal^- lors de l'isolement des souches $F^- Gal^- Pyr_1^- Sm^r$. Les croisements entre souches $Gal^- O^c gal$ et $Gal^- O^+ gal$, ainsi que les sélections, ont été effectués dans les mêmes conditions que les croisements entre deux souches $O^+ gal$. Pour chaque croisement les recombinants appartenant à 160 colonies distinctes ont été repiqués sur milieu solide galactosé en présence de streptomycine, puis sur milieu glucosé, avant d'être soumis au test de croissance sur milieu TMG-galactose.

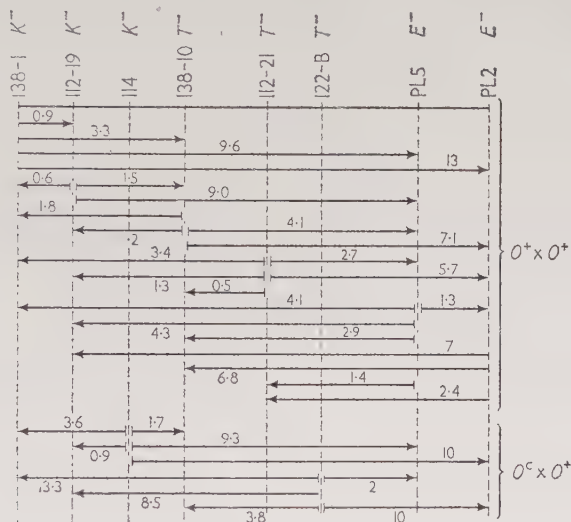


Fig. 2. Fréquence des recombinants Gal^+ issus de croisements entre deux souches Gal^- . Les fréquences des recombinants Gal^+ sont exprimées par le nombre de recombinants $Gal^+ Pyr_1^+ Sm^r$ ($\times 10^3$) rapporté au nombre des recombinants $Pyr_1^+ Sm^r$ pris pour unité. L'origine de chaque flèche désigne la mutation supportée par la souche Hfr et son extrémité la mutation affectant la souche réceptrice F^- dans le même croisement. Il n'a pas été rapporté de valeurs pour les croisements entre souches O^+ mettant en œuvre la souche $F^- 112-21$. Les fréquences de recombinaisons étaient anormalement basses quelle que soit la souche Hfr Gal^- utilisée; la détermination des activités enzymatiques chez la souche $F^- 112-21$ a révélé que cette souche était en réalité un double mutant $K^- T^-$. Sa sélection à partir du clone T^- s'est produite très probablement lors de l'isolement de la souche F^- sur milieu "EMB-galactose" (voir texte).

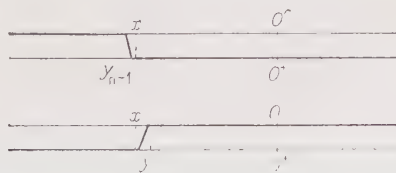


FIGURE 3

Lors d'un croisement du type $Hfr Gal^- x O^c gal \times F^- Gal^- y O^+ gal$, le locus $Ogal$ peut être soit externe, soit interne par rapport à l'intervalle qui sépare les sites mutés x et y . Dans le premier cas (Fig. 3), en raison de la liaison de $Ogal$ au segment Gal , les caractères $O^+ gal$ et $O^c gal$ seront très inégalement répartis parmi les descendants Gal^+ , puisque la manifestation de l'un des deux types suppose qu'une recombinaison supplémentaire se produise entre la mutation Gal^- la plus voisine et le locus $Ogal$;

si différentes mutations $y_1, y_2 \dots y_n \dots$, toutes situées du même côté que x par rapport à $Ogal$, sont mises en œuvre au cours de plusieurs croisements, on observera une brusque inversion du caractère (O^+gal ou O^cgal) le plus fréquemment représenté, lorsque la proximité relative de x et de l'une de ces mutations par rapport à $Ogal$ se trouvera elle-même inversée. Dans le second cas, au contraire, la répartition des caractères O^cgal et O^+gal pourra prendre une valeur quelconque, essentiellement déterminée par la distance relative qui sépare la mutation O^cgal des mutations x et y_n , et cette valeur variera de façon continue aussi longtemps que $Ogal$ restera localisé entre x et y_n . Ces règles peuvent être appliquées à l'examen des résultats rapportés dans le Tableau 7.

TABLEAU 7

Nombre de recombinants O^cgal parmi 100 recombinants $Gal^+Pyr_1^+Sm^r$ issus de divers croisements

Hfr Gal^-O^cgal $Pyr_1^+Sm^s \times F^-$ Gal^-O^+gal $Pyr_1^-Sm^r$		Hfr Gal^-O^+gal $Pyr_1^+Sm^r \times F^-$ Gal^-O^cgal $Pyr_1^-Sm^s$	
114 $\times$ PL2 : 98	122-B $\times$ PL2 : 96	PL2 $\times$ 114 : 90	PL2 $\times$ 122-B : 98
114 $\times$ PL5 : 91	122-B $\times$ PL5 : 94	PL5 $\times$ 114 : 91	PL5 $\times$ 122-B : 97
		112-21 $\times$ 114 : 88	112-21 $\times$ 122-B : 29
114 $\times$ 138-10 : 95	122-B $\times$ 138-10 : 7	138-10 $\times$ 114 : 64	138-10 $\times$ 122-B : 18
114 $\times$ 112-19 : 28	122-B $\times$ 112-19 : 12	112-19 $\times$ 114 : 33	112-19 $\times$ 122-B : 17
114 $\times$ 138-1 : 22	122-B $\times$ 138-1 : 12	138-1 $\times$ 114 : 24	138-1 $\times$ 122-B : 17

(Phénotype enzymatique des mutants: Tableau 5.)

La mutation Gal^{-114} est localisée entre les mutations $Gal^{-(112-19)}$ et $Gal^{-(138-10)}$ et la mutation $Gal^{-(122-B)}$ entre les mutations $Gal^{-(112-21)}$ et Gal^{-PL5} . Cette localisation est suggérée par les discontinuités qui caractérisent la ségrégation du caractère O^cgal dans les croisements correspondants et s'avère la seule compatible avec l'ensemble des résultats. Elle est en agrément avec le fait que la mutation 114 concerne spécifiquement l'activité de la galactokinase et la mutation 122-B l'activité de la transférase. Elle est également en accord avec la fréquence relative des recombinants Gal^+ dénombrés dans les croisements $O^+gal \times O^cgal$.

La mutation O^cgal , extérieure aux deux gènes qui gouvernent l'activité de la galactokinase et de la transférase, se trouve par rapport à eux du même côté que le déterminant relatif à l'épimérase: lors des croisements $K-O^cgal \times E-O^+gal$ ou $T-O^cgal \times E-O^+gal$, la plupart des recombinants sont en effet de type O^cgal ; et la mutation O^cgal paraît localisée à l'extrémité distale (Fig. 4) du déterminant qui gouverne l'activité de l'épimérase sans qu'il soit toutefois possible de préciser si le locus qu'elle affecte appartient ou non à ce déterminant: la liaison la plus forte s'observe en effet entre le locus $Ogal$ et le locus qui supporte la plus distale des mutations étudiées du segment Gal ($PL2$).

(c) Conclusions. L'existence de trois déterminants gouvernant respectivement l'activité de la galactokinase, de la transférase et de l'épimérase se trouve vérifiée par la mise en évidence de segments de génome qu'affectent spécifiquement les mutations supprimant l'activité de chacune des enzymes. Bien que la démonstration directe n'en ait pas été apportée, il est peu douteux que ces trois gènes déterminent la structure des protéines correspondantes. La confrontation des résultats des croisements

entre souches *O^cgal* et *O⁺gal* a permis de localiser la mutation *O^cgal* avec une précision suffisante pour justifier l'interprétation selon laquelle le phénotype constitutif est déterminé dans cette souche par l'effet pleiotrope d'une unique mutation. L'effet de celle-ci ne s'exerce qu'en "*cis*" et sur l'expression de trois déterminants adjacents, ce qui suggère qu'il concerne très directement les modalités d'une transcription intrusive de l'information génétique contenue dans l'ensemble de cette séquence nucléotidique.

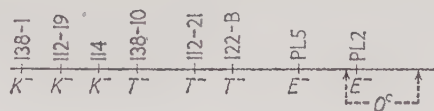


FIGURE 4

Le segment *Gal* représente donc un "*opéron*", dépendant d'un opérateur de régulation pleiotrope dont la structure est inscrite dans la séquence génétique qui constitue le locus *Ogal*. On doit alors prévoir que, si les conditions de la transcription sont modifiées par l'intervention du mécanisme régulateur spécifique, la transcription de l'information contenue dans chacun des déterminants de structure sera affectée au même degré: l'expression de ces gènes doit être non seulement qualitativement, mais quantitativement coordonnée (Jacob & Monod, 1961b; Ames & Garry, 1959); en d'autres termes, les activités enzymatiques correspondantes doivent varier de façon strictement parallèle et demeurer entre elles dans un rapport constant lorsqu'on les mesure chez des cellules sauvages à différents niveaux d'induction, ou chez divers mutants de régulation. A ce sujet, la coordination mise en évidence (Fig. 5) entre la

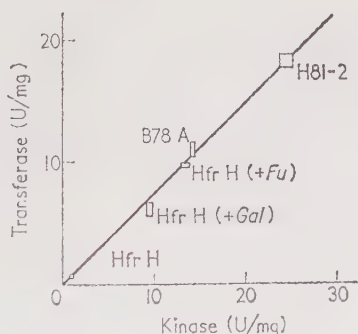


Fig. 5. Biosynthèse de la galactokinase et de la transférase. Les bactéries étaient en voie de croissance en milieu minéral 63 au glycérol en présence éventuellement de D-fucose 10^{-3} M (+ *Fu*). L'exception de la culture notée (+ *Gal*) qui était effectuée en milieu galactosé. Les suspensions ont été centrifugées et reprises en milieu 63 contenant les facteurs nécessaires à la protection de la galactokinase dans les extraits (Buttin, 1963). Pour chaque suspension, trois déterminations indépendantes de l'activité de l'une et l'autre enzyme ont été faites à partir d'un même extrait obtenu par traitement sonique des bactéries. Les valeurs extrêmes de ces déterminations ont été reportées sur la figure.

La biosynthèse de la galactokinase et celle de la transférase paraît très significative: les deux activités enzymatiques demeurent proportionnelles dans des conditions où les valeurs absolues de ces activités varient elles-mêmes dans le rapport de 1 à 25 par

suite d'altérations génétiques du système de régulation ou de son inactivation par différents inducteurs. Les déterminations que nous avons effectuées de l'activité de l'épimérase sont elles-mêmes compatibles avec l'hypothèse d'une biosynthèse quantitativement coordonnée de cette enzyme et des deux autres protéines.

(iii) *Le contrôle de la transcription primaire*

Ces observations situent l'action du répresseur au niveau d'une structure renfermant, non encore dissociée, l'ensemble de l'information contenue dans l'opéron *galactose*. La nature des structures cellulaires satisfaisant à cette condition a été discutée par Jacob & Monod (1961b) à propos de l'opéron *lactose*. L'opéron lui-même représente une solution possible évidente: la répression s'exercerait dans ce cas au niveau génétique et gouvernerait le taux auquel s'effectue la transcription, sous forme d'ARN-messager, de l'information contenue dans l'ADN correspondant.

TABLEAU 8

Activité de la galactokinase et synthèse de l'ARN-messager spécifique Gal dans différentes conditions d'efficacité de la répression

Souche	Source carbonée	Inducteur (D-fucose)	ARN messenger <i>Gal</i> † (% ARN messenger total)	Activité de la galactokinase (U/mg)
Hfr H	Glucose	0	0.1	0.19
Hfr H	Glycérol	10 ⁻³ M	1.1	6.3
H81-2	Glycérol	0	3.0	10.0

† Extrait de Attardi, Naono, Gros, Buttin & Jacob (1963).

Cette interprétation a été vérifiée dans le cas de l'opéron *galactose* par le résultat d'expériences récentes (Attardi, Naono, Gros, Brenner & Jacob, 1962; Attardi, Naono, Gros, Buttin & Jacob, 1963). Les quantités d'ARN-messager spécifique de cet opéron ont été déterminées chez la souche Hfr H dans des conditions correspondant à une plus ou moins grande efficacité de la répression, et chez le mutant *O^{cgal}* H-81-2. L'ARN-messager spécifiquement hybridable avec les gènes de l'opéron *galactose*† représente, parmi l'ARN-messager total, une fraction dont l'importance croît parallèlement, semble-t-il, à l'activité de la galactokinase mesurée chez les mêmes souches, placées dans des conditions de culture semblables (Tableau 8). Cette conclusion situe l'action du mécanisme régulateur au niveau de la transcription primaire, identifiant de ce fait l'opérateur de régulation au locus *Ogal*.

Les résultats ne préjugent pas de la nature du processus par lequel s'effectue cette transcription. Selon l'hypothèse formulée par Jacob & Monod (1961b), la transcription de l'information contenue dans un opéron serait un processus séquentiel polarisé dont le répresseur serait susceptible de suspendre l'initiation. Faisant suite à la localisation liminaire de l'opérateur *lactose*, la localisation de l'opérateur *galactose* à une extrémité de l'opéron correspondant donne un crédit supplémentaire à cette

† L'ARN-messager spécifique de l'opéron *galactose* était estimé en mesurant l'ARN-messager d'*E. coli* capable de s'hybrider avec l'ADN d'un phage transducteur, déduction faite de la faible quantité de cet ARN qui s'hybride avec le génome du phage λ de type sauvage.

interprétation; celle-ci paraît également justifiée par les propriétés récemment découvertes d'une délétion de l'extrémité du segment constitué par les gènes de structure des enzymes de biosynthèse du tryptophane: l'expression des déterminants de structure situés en "cis" est apparue déréprimée (Matsuhira, Kida, Ito, Sato & Yamamoto, 1962). Plusieurs observations relatives au système *lactose* ont été mentionnées à l'appui de ce modèle. Des mutations récessives (mutations O^0), qui sont localisées au voisinage immédiat des mutations O^c , abolissent simultanément l'activité des enzymes de cet opéron, et ne permettent pas la complémentation des mutants correspondants par les mutants affectés au niveau d'un gène de structure; ceci a suggéré que les mutations O^0 (*mutations négatives d'opérateur*) suspendraient—ou troubleraient—à son début la lecture, par l'enzyme de transcription, de l'information contenue dans l'opéron. Une interprétation analogue a été proposée à différentes reprises de l'effet négatif pléiotrope exercé sur l'activité d'enzymes fonctionnellement liées dont les déterminants sont contigus, par des mutations localisées à une extrémité de la séquence génétique (Ames, Garry & Herzenberg, 1960; Englesberg, 1961).

Chez une autre classe de mutants du système *lactose* (*mutants polaires*) des mutations au niveau de l'un ou l'autre des déterminants structuraux réduisent l'activité non seulement de l'enzyme correspondante mais de l'enzyme (ou des enzymes) dont l'information structurale serait lue postérieurement, dans l'hypothèse d'une transcription polarisée débutant au niveau de l'opérateur. Plusieurs mutants triplement défectifs pour les enzymes de métabolisme du galactose ont été isolés chez *E. coli* (Kalekar *et al.*, 1959; Lederberg, 1960). Ils ne complémentent aucun des mutants déficients en une seule des activités enzymatique et ne sont complémentés par aucun d'eux (Lederberg, 1960; et communication en référence dans Adler & Kaiser, 1963). La localisation des mutations correspondantes, entreprise indépendamment par différents auteurs, n'a pas encore abouti à des conclusions définitives (Morse, 1962; Adler & Kaiser, 1963). S'il paraît peu probable que les mutations étudiées soient localisées à l'extrémité de l'opéron, il est possible qu'elles concernent des sites intérieurs au gène gouvernant l'activité de l'épimérase, ce qui suggère qu'il pourrait s'agir de mutations de type polaire. Dans l'état actuel des données expérimentales relatives au phénotype triplement défectif du système *galactose*, il ne semble pas que les propriétés de ces mutants puissent être utilement avancées comme argument pour ou contre l'hypothèse d'une transcription polarisée continue d'une extrémité à l'autre de l'opéron.

(d) *Déterminisme génétique de la biosynthèse de galactose-perméase*

Nous avons montré dans la première partie de cette étude (Buttin, 1963) que la galactose-perméase est inductible par le galactose et le fucose, ce qui suggère que, dans certaines conditions, elle peut devenir limitante pour l'utilisation du galactose. La question se pose donc de savoir si la synthèse de la perméase est gouvernée par le même circuit de régulation que celle des autres protéines de la chaîne métabolique du galactose. L'étude directe du taux de synthèse de la galactose-perméase est considérablement compliquée par le fait qu'elle ne peut être abordée avec précision que chez des mutants dépourvus de galactokinase, chez lesquels cette perte de fonction détermine l'induction par voie interne du système de perméation. Certaines observations indirectes apportent cependant des indications très significatives, semble-t-il, sur le contrôle génétique de la biosynthèse de la perméase. Ces indications sont les suivantes:

(1) l'existence d'un déterminant qui gouverne spécifiquement l'activité de la perméase a été reconnue (Buttin, 1963); ce gène (*Pgal*), dans lequel il paraît à priori raisonnable de voir le déterminant de structure de la protéine, n'appartient pas à l'opéron *galactose*. En effet le défaut d'activité de la perméase (caractère *P⁻gal*) a été mis en évidence chez une souche 20SO isolée comme recombinant *Gal⁺Sm^r* d'un croisement entre Hfr 30SO (*Gal⁺Sm^s*) et F⁻ P678 (*Gal^{-b}Sm^r*). La mutation *P⁻gal* affectait la lignée parentale F⁻: la souche P678 étant de phénotype *K⁻*, il a été vérifié par la technique isotopique directe qu'elle n'accumule pas de galactose. La souche Hfr 30SO, pleinement inductible par le D-fucose 10^{-3} M, manifeste le phénotype sauvage pour ce caractère. La souche 30SO a reçu le segment *Gal* du parent Hfr puisque la mutation *Gal^{-b}* concerne ce segment (Wollman & Jacob, 1957) et conservé le caractère *P⁻gal* de la souche F⁻: le déterminant *Pgal* n'apparaît donc pas lié au segment *Gal*; ceci est confirmé par l'observation que chez différents recombinants *Gal⁺* obtenus à partir de cette lignée F⁻ *Gal⁻*, la galactokinase n'est que partiellement induite par une concentration de fucose (10^{-3} M) saturante pour les souches sauvages;

(2) sur milieu TMG-galactose, la croissance des clones *O^cgal* n'est pas inhibée à condition qu'ils soient de caractère *y⁺* (capables de synthétiser la β -galactoside-perméase); la croissance des clones constitutifs de génotype *Gal⁺O^cgal y⁻* est inhibée aussi fortement (ou presque, suivant les souches et recombinants étudiés) que la croissance des clones inductibles *Gal⁺O⁺gal y⁻*. La confusion qui peut en résulter lorsqu'on dénombre sur ce milieu les recombinants inductibles et constitutifs a été soulignée au début de cette étude. On remarque que l'intervention du déterminant *y* a un effet paradoxal puisque l'inhibition de croissance concerne les clones *y⁻*, qui accumulent le moins activement le TMG (Rickenberg, Cohen, Buttin & Monod, 1956); et

(3) l'inhibition de croissance des clones constitutifs *y⁻* n'a été observée chez aucun des mutants ou recombinants chez lesquels la synthèse constitutive des trois enzymes résulte de la mutation *R⁻gal* du gène régulateur (Planche I).

Une interprétation évidente de ces résultats est dictée par la remarque que le galactose, à la concentration à laquelle il est utilisé (2×10^{-2} M) manifeste très vraisemblablement une affinité pour la β -galactoside-perméase suffisante pour que ce système participe à sa concentration dans les cellules. Il est clair que le déterminant *Pgal* extérieur à l'opéron *galactose* ne saurait être affecté par la mutation *O^cgal*: de fait, il a été vérifié que la répression exercée par le TMG sur la synthèse de perméase est maintenue chez les mutants *O^cgal*. Sur milieu TMG-galactose, la pénétration du galactose est donc susceptible de limiter le taux de croissance, l'expression du génotype *O^cgal* ne devenant possible que lorsque l'activité conjuguée de deux perméases (*Pgal* et *y*) réalise une concentration intracellulaire de galactose suffisante.

Le fait que le caractère *R⁻gal* s'exprime librement, indépendamment de la présence ou de l'absence de l'allèle *y⁺* indique, semble-t-il, que la perméation du galactose n'est plus sensible chez les cellules *R⁻gal*, à l'effet des inhibiteurs de l'induction: cette situation peut à priori résulter soit de ce que la biosynthèse de la galactose-perméase dépend du gène régulateur *Rgal*, soit de ce que les mutants *R⁻gal* ont accumulé deux mutations dont l'une concerne spécifiquement la régulation de synthèse de la perméase. La seconde hypothèse est très improbable.



PLANCHE I. Croissance comparée sur milieu galactosé et sur milieu "TMG-galactose" de différents clones "inductibles" et "constitutifs". Deux colonies de chaque clone ont été repiquées côte à côte, "en étoile". De haut en bas, colonnes de gauche: Hfr H: $Gal^+ O^+gal R^+gal y^+$; Hfr H81-2: $Gal^+ O^cgal R^+gal y^+$; recombinant (Hfr H81-2 $\times$ F $^-$ B34-5): $Gal^+ O^cgal R^+gal y^-$; recombinant y^- du même croisement: $Gal^+ O^cgal R^+gal y^-$.

Colonnes de droite: C600Sr: $Gal^- O^+gal R^+gal y^-$; B78 A: $Gal^- O^+gal R^-gal y^-$; transduit de B106-1: $Gal^- O^+gal R^-gal y^-$ ($\lambda Gal^+ O^cgal$); transduit de B106-1: $Gal^- O^+gal R^-gal y^-$ ($\lambda Gal^+ O^+gal$).

(a) Les deux mutants *R⁻gal y⁻* étudiés (B78A et 112-1), sélectionnés par des techniques différentes, sont l'un et l'autre insensibles à l'inhibition par le TMG.

(b) De nombreux recombinants *y⁻* ont été obtenus au cours de certains croisements rapportés dans les Tableaux 2 et 3. La ségrégation de l'allèle sauvage d'un gène régulateur propre à la perméase aurait fait apparaître des recombinants *R⁻gal y⁻* synthétisant constitutivement la galactokinase mais dont la croissance aurait été inhibée sur milieu TMG-galactose au même titre que celle des recombinants *O^cgal y⁻*: malgré de nombreux contrôles, de tels clones n'ont pas été décelés.

Il est donc très probable que le gène régulateur *Rgal* exerce son effet sur la biosynthèse de perméase comme sur celle des autres protéines de cette chaîne métabolique.

4. Conclusions

Les conclusions précédentes peuvent être coordonnées dans le modèle très simple d'un circuit de régulation analogue à celui qui a été proposé pour le système *lactose*: un gène régulateur *Rgal* qui, dans ce cas, apparaît topologiquement indépendant de l'opéron qu'il gouverne, élabore très vraisemblablement le répresseur cytoplasmique de ce système; l'inactivation du répresseur par un inducteur déréprime simultanément la synthèse des trois enzymes galactokinase, transférase et épimérase; en l'absence d'inducteur, la combinaison du répresseur avec un opérateur spécifique suspend, ou plus précisément limite la transcription primaire de l'ensemble de l'information contenue dans l'opéron *galactose*. La biosynthèse de la galactose-perméase est très vraisemblablement gouvernée par le même gène régulateur, exerçant son effet au niveau d'un opérateur distinct.

Une partie importante de cette étude a été consacrée à l'analyse de l'opéron *galactose*, en raison des exigences très précises que comporte la caractérisation d'un opérateur de régulation: un opéron polycistronique peut être reconnu dans une certaine mesure en tant qu'*unité de transcription* par la mise en évidence de mutations régulatrices pléiotropes, de caractère récessif, ne permettant pas la complémentation par un segment homologue muté dans un gène de structure; cependant, comme le trouve l'existence de mutants polaires, la transcription peut être brouillée ou suspendue à un niveau quelconque de la séquence génétique; la localisation du défaut correspondant ne saurait constituer la localisation d'un opérateur de régulation stéréospécifique; un opéron, semble-t-il, ne peut être reconnu sans ambiguïté comme *unité de régulation* que dans la mesure où il a été vérifié que la régulation concernait simultanément et à un même degré l'expression des déterminants de structure qui le composent; et un opérateur de régulation ne peut être identifié comme tel que par la localisation de mutations de régulation, en l'occurrence des mutations constitutives à effet pléiotrope limitée à une séquence génétique située en "*cis*" et contiguë. L'ensemble de ces propriétés n'avaient été établies, à notre connaissance, que pour l'opéron *lactose* et pour son opérateur; cette étude a confirmé toutes les prédictions du modèle de Jacob et Monod. Dans le système *lactose*, les mutations constitutives d'opérateur ou nues ne dérépriment que partiellement la biosynthèse des enzymes correspondantes: les propriétés du mutant *O^cgal* que nous avons étudié montrent qu'en fait une mutation d'opérateur peut provoquer une dérépression aussi complète qu'une mutation du gène régulateur.

La subordination au même gène régulateur d'un second opéron auquel appartient le déterminant de structure de la perméase est, nous l'avons montré, très probable. Le contrôle simultané par un même gène régulateur de plusieurs opérons a

été envisagé dans le cas des enzymes de biosynthèse de l'arginine (Vogel, 1961; Maas, 1961; Gorini, Gundersen & Burger, 1961) et plus récemment dans le cas des enzymes du métabolisme des pyrimidines (Beckwith *et al.*, 1962). La situation mise en évidence dans le système d'utilisation du galactose représente, semble-t-il, un degré d'évolution intermédiaire entre le groupement complet de tous les éléments du circuit de régulation, tel qu'il s'observe dans le système *lactose*, et le fractionnement en unités indépendantes des divers gènes de structure et du gène régulateur. La localisation du gène de structure de la perméase, pour lequel on ne saurait exclure *a priori* la possibilité d'une liaison avec le gène régulateur, devrait permettre de préciser dans une certaine mesure ce degré de "différenciation" fonctionnelle de la séquence enzymatique.

Cette étude, dont certaines conclusions ont fait l'objet de communications préliminaires (Buttin, 1961; Buttin, 1962) a bénéficié du soutien du "Jane Coffin Childs Memorial Fund", du "National Institutes of Health", du Commissariat à l'Energie atomique et de la Délégation générale à la Recherche scientifique.

L'auteur exprime sa profonde reconnaissance au Professeur J. Monod et à F. Jacob qui ont guidé ses recherches. Il remercie très sincèrement MM. F. Gros et E. L. Wollman pour l'intérêt qu'ils ont porté à son travail et pour les conseils qu'ils lui ont prodigués.

REFERENCES

- Adler, J. & Kaiser, A. D. (1963). *Virology*, **19**, 117.
 Ames, B. N. & Garry, B. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1453.
 Ames, B. N., Garry, B. & Herzenberg, L. A. (1960). *J. Gen. Microbiol.* **22**, 369.
 Arber, W. (1958). *Arch. Sci., Genève*, **11**, 259.
 Attardi, G., Naono, S., Gros, F., Brenner, S. & Jacob, F. (1962). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **255**, 2303.
 Attardi, G., Naono, S., Gros, F., Buttin, G. & Jacob, F. (1963). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **256**, 805.
 Beckwith, J. R., Pardee, A. B., Austrian, R. & Jacob, F. (1962). *J. Mol. Biol.* **5**, 618.
 Buttin, G. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 213.
 Buttin, G. (1962). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **255**, 1233.
 Buttin, G. (1963). *J. Mol. Biol.* **7**, 164.
 Calef, E. & Licciardello, G. (1960). *Virology*, **12**, 81.
 Cohen-Bazire, G. & Jolit, M. (1953). *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 1.
 Davis, B. D. (1948). *J. Amer. Chem. Soc.* **70**, 4267.
 Englesberg, E. (1961). *J. Bact.* **81**, 996.
 Fukasawa, T., Jokura, K. & Kurahashi, K. (1962). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 121.
 Fukasawa, T. & Nikaido, H. (1961). *Biochim. biophys. Acta*, **48**, 470.
 Gorini, L., Gundersen, W. & Burger, M. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 173.
 Hayes, W. (1953). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **18**, 75.
 Jacob, F. & Monod, J. (1961a). *J. Mol. Biol.* **3**, 318.
 Jacob, F. & Monod, J. (1961b). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 193.
 Jacob, F. & Wollman, E. L. (1957). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **245**, 1840.
 Jacob, F. & Wollman, E. L. (1961). *Sexuality and the Genetics of Bacteria*. New York: Academic Press.
 Kalckar, H. M., Kurahashi, K. & Jordan, E. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1776.
 Kaudewitz, F. (1959). *Nature*, **183**, 1829.
 Kurahashi, K. & Wahba, A. J. (1958). *Biochim. biophys. Acta*, **30**, 298.
 Lederberg, E. M. (1960). In *Microbial Genetics*, p. 115. Cambridge: University Press.
 Lennox, E. S. (1955). *Virology*, **1**, 190.
 Maas, W. K. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 183.
 Matsuihiro, A., Kida, S., Ito, J., Sato, K. & Imamoto, F. (1962). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 204.
 Monod, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Paris: Hermann.
 Morse, M. L. (1962). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **48**, 1314.

- Lorise, M. L., Lederberg, E. M. & Lederberg, J. (1956a). *Genetics*, **41**, 142.
- Lorise, M. L., Lederberg, E. M. & Lederberg, J. (1956b). *Genetics*, **41**, 758.
- Rickenberg, H. V., Cohen, G. N., Buttin, G. & Monod, J. (1956). *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 829.
- offer, R. L. (1961). *J. Bact.* **82**, 471.
- undararajan, T. A., Rapin, A. M. C. & Kalekar, H. M. (1962). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **48**, 2187.
- Taylor, A. L. & Adelberg, E. A. (1960). *Genetics*, **45**, 1233.
- Togel, H. J. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 163.
- Weigle, J. J. & Delbrück, M. (1951). *J. Bact.* **62**, 301.
- Wollman, E. L. & Jacob, F. (1957). *Ann. Inst. Pasteur*, **93**, 323.
- armolinsky, M. B., Jordan, E. & Wiesmayer, H. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 217.
- armolinsky, M. B., Wiesmayer, H., Kalckar, H. M. & Jordan, E. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1786.

Mécanismes Régulateurs dans la Biosynthèse des Enzymes du Métabolisme du Galactose chez *Escherichia coli* K12

III. L' "Effet de Dérépression" provoqué par le Développement du Phage λ

G. BUTTIN

Service de Biochimie cellulaire, Institut Pasteur, Paris, France

(Received 12 June 1963)

During the vegetative development of λGal^+ transducing phages in Gal^- cells of *E. coli*, the inducible enzyme galactokinase is synthesized constitutively. A similar, albeit weaker, constitutive synthesis of this enzyme also occurs upon irradiation of Gal^+ cells carrying the wild-type λ prophage. On the other hand, the infection of Gal^+ cells by a λ phage reduces the rate of induced synthesis of the enzyme. The preliminary association of the Gal^+ genes with a λ prophage (or with topologically related prophages) in a structural unit appears to be essential to the derepression of the bacterial enzyme synthesis. The constitutive synthesis does not seem to result from an increase in the number of the *Gal* operons in the cell, since it occurs at maximal rate after induction of defective λ prophages, which are unable to replicate their own genome. Also, it is not significantly affected by the presence of an inhibitor of DNA synthesis (phenylethylalcohol) during λGal^+ vegetative development. The experimental results suggest that the primary transcription of host genes in close association with a vegetative viral genome can occur under conditions of complete insensitivity, or inaccessibility, to the specific cellular repressor.

1. Introduction

Nous avons établi précédemment (Buttin, 1963) que les trois déterminants "de structure" de la galactokinase (K^+), de la transférase (T^+) et de l'épimérase (E^+) constituent un "opéron".

Cette étude a largement mis à profit les propriétés du système de transduction des déterminants *Gal* par le phage λ , permettant d'obtenir des cellules diploïdes pour cette portion de génome (Morse, Lederberg & Lederberg, 1956a,b). L'association fréquente du génome de λ et du segment *Gal* est vraisemblablement due au fait que le prophage λ est localisé au voisinage immédiat de ce segment (Wollman, 1953; Lederberg & Lederberg, 1953; Jacob, 1955); et il paraît bien établi que cette association correspond à une substitution des gènes *Gal* à certains déterminants du génome phagique, comme en témoigne l'observation que les phages transducteurs sont défectifs pour l'accomplissement de certaines fonctions gouvernées par le génome viral (Arber, Kellenberger & Weigle, 1957; Arber, 1958; Campbell, 1959).

Nous avons eu l'occasion de montrer que l'expression des gènes *Gal* d'un prophage transducteur hybride λdg (noté ici: λGal^+) demeurerait soumise à la même régulation que lorsque ces déterminants sont intégrés dans le chromosome bactérien. La biosynthèse des enzymes dont ils gouvernent l'activité demeure inductible lorsque le génome de la

bactérie-hôte ne porte pas de mutation de régulation. La biosynthèse de ces enzymes est au contraire constitutive lorsque le gène régulateur *Rgal*, spécifique de ce système, et non transductible, est inactivé dans la bactérie réceptrice (mutation *R-gal*); ou lorsque le prophage transducteur provient d'une souche chez laquelle l'opérateur de régulation des gènes *Gal* (*Ogal*) est lui-même affecté par une mutation constitutive (mutation *O'gal*).

L'hypothèse que nous avons discutée, selon laquelle de tels systèmes de régulation opèrent au niveau génétique, suggérerait cependant que l'expression d'un segment *Gal* associé à un prophage pourrait se trouver profondément modifiée au cours de la multiplication végétative de ce prophage. Nous avons effectivement observé que l'induction du prophage entraîne une synthèse *constitutive* de la galactokinase: en d'autres termes, la multiplication intracellulaire du virus provoque dans certaines conditions le démasquage de potentialités génétiques de la cellule-hôte. Le présent mémoire est consacré à la description et à l'analyse de cet effet.

Les expériences que nous avons réalisées, et dont certaines ont fait l'objet de communications préliminaires (Buttin, Jacob & Monod, 1960; Buttin, 1961) concernent les conditions de synthèse de la galactokinase. Les conséquences de l'induction d'un prophage transducteur ou sauvage sur la synthèse de la transférase et de l'épimérase ont été étudiées indépendamment par Yarmolinsky *et al.* (Yarmolinsky & Wiesmayer, 1960; Yarmolinsky, Jordan & Wiesmayer, 1961; Yarmolinsky, 1963). L'expression des gènes de l'opéron bactérien "*lactose*" associés au génome du phage transducteur P1 est également en cours d'analyse (Revel, Luria & Rotman, 1961; Revel & Luria, 1961; Revel, Luria & Young, 1961).

2. Matériel et Méthodes

(a) Souches bactériennes et virales

La terminologie qui traduit les relations entre bactériophages tempérés et bactéries-hôtes, ainsi que les notations correspondantes, ont été codifiées par Jacob, Lwoff, Siminovitch & Wollman (1953). Une terminologie propre aux particules transductrices des caractères *Gal* a été proposée par Morse *et al.* (1956b) et complétée par Arber (1958). Rappelons qu'une bactérie *lysogène* perpétue un prophage; celui-ci confère à la bactérie *lysogène* une *immunité* qui lui permet de survivre à l'infection par un prophage homologue (notation: souche X, lysogénisée par le prophage λ : X(λ)). Le terme d'*induction* désigne le déclenchement provoqué du développement du prophage. Lorsque le prophage porte un défaut qui empêche la production de phages infectieux (prophage *défectif*) la bactérie est dite *lysogène défective*. Les particules du phage λ transductrices des caractères *Gal* étant défectives, les bactéries *Gal*⁻ lysogénisées par un prophage transducteur des caractères *Gal* de type sauvage (noté: λGal^+) sont dites *hétérogénotes défectives* et notées: *Gal*-(λGal^+). Les souches hétérogénotes qui possèdent, outre le prophage transducteur, des éléments génétiques d'un prophage du type sauvage sont dites *hétérogénotes normales* et notées: *Gal*-(λ)(λGal^+). Nous noterons enfin $\lambda Gal^+ O'gal$ les phages transducteurs issus d'une souche *Gal*⁺(*K*⁺*T*⁺*E*⁺) affectée par la mutation *O'gal*; le symbole λGal^+ désignera donc des particules qui, en toute rigueur, devraient être notées $\lambda Gal^+ O^+gal$.

Un certain nombre de souches décrites ou mentionnées en référence dans les deux premières parties de cette étude (C600, *Gal*⁻¹⁻², Hfr 138-1, Hfr 112-21, B34-5) ont été utilisées pour ces expériences qui ont en outre mis en œuvre les souches particulières suivantes: deux doubles mutants *K*⁻*T*⁻ isolés en deux étapes (isolement d'un mutant *T*⁻ et contre-sélection du caractère *K*⁺ par croissance en milieu au glycérol en présence de galactose): B170-A, issu de la souche *R-gal* B78-A; et 132-1, obtenu à partir du mutant *O'gal* H81-2; Y10 (Tatum & Lederberg, 1947), lysogène pour le phage λ de type sauvage; P14 (Jacob & Wollman, 1956a), P22, P30, P32, P34 (Jacob, Fuerst & Wollman, 1957)

et T5, T11, T27 (Goodgal & Jacob, non publié): ces différentes souches sont toutes lysogènes défectives et ont été isolées à partir de la souche Y10; les prophages défectifs seront notés $\lambda d14$, $\lambda d22$, etc.; C600(82), C600(434), C600(21): les prophages correspondants ont été décrits par Jacob & Wollman (1956b). La souche lysogène Y10 étant le parent de la souche sensible C600 sera notée occasionnellement C600(λ). La souche $Gal^-(\lambda)/Fgal^+$ utilisée dans ces expériences était un clone Gal^+Sm^r issu du croisement de la souche lysogène $Gal^{-1-2}Sm^r(\lambda 26)$ avec une souche sensible portant l'épisome sexuel $Fgal^+$ (isolée par F. Jacob). La souche $gal^-/Fgal^+(\lambda)$ avait été isolée par F. Jacob (souche C28). Le caractère hétérogénote de ces souches, ainsi que la position des déterminants Gal du type sauvage, ont été vérifiés par le fait qu'elles ségrégeaient des clones Gal^- (identifiés comme tels sur milieu EMB-galactose); et leur lysogénie, par réplique des colonies sur une souche indicatrice sensible. La position du prophage a été contrôlée chez la souche C28 par la détermination du taux d'induction zygotique (Jacob & Wollman, 1956b) que provoquait son croisement avec une souche sensible.

L'infection et la lysogénisation des souches sensibles ont été réalisées à l'aide des phages λ^+ , $\lambda 26$ et $\lambda papa$ (Kaiser, 1957); ces trois phages dont les caractéristiques d'immunité sont identiques, seront désignés indifféremment par la lettre λ . Le mutant "clair" λc (Jacob & Wollman, 1954) a été également utilisé.

(b) Cultures bactériennes

Sauf mention contraire les cultures étaient effectuées en milieu minéral 63, contenant les facteurs de croissance indispensables; la source carbonée était le glycérol.

(c) Techniques de virologie

Les techniques générales de virologie utilisées sont celles qui ont été décrites par Adams (1950). Les conditions d'isolement des souches hétérogénotes normales ont été précédemment décrites (Buttin, 1963). Les souches hétérogénotes défectives étaient obtenues par infection à basse multiplicité, dans les conditions décrites par Arber (1958). La présence des prophages normaux et défectifs était testée à l'aide des techniques utilisées par cet auteur. Les souches $Gal^{-1-2}(\lambda Gal^+)$ et $Gal^{-1-2}(\lambda)(\lambda Gal^+)$ appartenaient à la collection de F. Jacob.

Les lysats à basse fréquence de transduction (10^{-4} à 10^{-6} phage transducteur/phage λ) étaient obtenus en soumettant des bactéries lysogènes au rayonnement ultraviolet (u.v.); les lysats à haute fréquence de transduction† (HFT) en soumettant au même traitement des bactéries hétérogénotes normales. Les lysats HFT ont été concentrés par centrifugation à 100,000 g.; les culots étaient repris en 10^{-2} M- $MgSO_4$; ce traitement éliminait des lysats la galactokinase qu'ils contenaient. Les lysats étaient stérilisés par le chloroforme; leur stérilité était vérifiée avant utilisation par étalement d'une goutte de lysat sur milieu gélosé complet. Le chloroforme était éliminé avant utilisation par agitation quelques min à 37°C. Deux lysats HFT ont été principalement utilisés pour ces expériences: C173, obtenu à partir de la souche hétérogénote 132-1(λ)(λGal^+O^gal) homogénote pour le caractère O^gal ; E60B, obtenu à partir de 112-21(λ)(λGal^+) homogénote pour le caractère O^+gal .

Les phages de type sauvage ont été titrés dans les conditions décrites par Arber (1958). Nous avons eu recours pour estimer le titre en phages transducteurs des lysats HFT à la technique d'infection simultanée de cellules Gal^- par un phage transducteur et un phage sauvage "coopérant" décrite par cet auteur. Cette méthode a mis en évidence dans le lysat C173 3.5 fois moins de phages transducteurs que de phages λ , et 10 fois moins dans le lysat E60B.

(d) Techniques particulières aux expériences de cinétique de synthèse

Expériences d'infection: l'adsorption des phages était assurée par incubation d'un volume choisi de lysat pendant 15 à 18 min à 37°C en présence de bactéries provenant d'une culture exponentielle, centrifugée et reprise en 10^{-2} M- $MgSO_4$. La concentration de ces cellules était supérieure ou égale à 10^9 bact./ml. Dans ces conditions l'adsorption des

† Abréviation: HFT = haute fréquence de transduction.

phages a constamment été trouvée supérieure à 90%. Après adsorption des phages la suspension était centrifugée à 4°C et le culot repris, à même température, en quelques ml. de milieu synthétique. Cette suspension concentrée était répartie dans les fioles d'expérience contenant un volume complémentaire de milieu au glycérol préchauffé et éventuellement l'inducteur. Le temps 0 des expériences d'infection correspond à cet instant, à partir duquel les cultures étaient agitées à 37°C.

Induction des prophages par irradiation: Le développement du prophage était induit dans les souches lysogènes en exposant les cellules aux rayons u.v. L'irradiation était effectuée à température ordinaire dans des conditions essentiellement semblables à celles qui ont été décrites par Jacob (1954). Les volumes de suspension irradiés étaient en général de 12 ml., au maximum de 30 ml. en couche d'épaisseur toujours inférieure à 2 mm. Le temps d'exposition provoquant l'induction du prophage dans un nombre maximal de cellules avait été initialement déterminé, et la constance du flux lumineux était contrôlée régulièrement. Les milieux synthétiques utilisés absorbant peu les rayons u.v., les irradiations étaient appliquées directement aux cellules en voie de croissance, ou aux complexes bactéries-phages surinfectants obtenus par la technique précédemment décrite, et les cellules étaient aussitôt replacées dans leurs conditions normales de croissance. Les manipulations suivant l'irradiation et en particulier la culture des cellules irradiées étaient effectuées à l'obscurité afin d'éviter la photorestauration par la lumière visible.

(e) *Dosage de la galactokinase*

Les conditions du dosage étaient, pour l'essentiel, semblables à celles qui ont été précédemment décrites (Buttin, 1963); 1 Unité (U): quantité d'enzyme capable de phosphoryler 1 μ mole de galactose/heure.

3. Résultats

(A) *Mise en évidence d'une synthèse constitutive de galactokinase consécutive au développement végétatif de λ Gal⁺*

Le développement végétatif d'un phage hybride λ Gal⁺ peut être suivi soit au cours de l'infection de bactéries sensibles par des phages transducteurs infectieux, soit après l'induction du prophage transducteur dans des cellules hétérogénètes. Nous avons observé la cinétique de synthèse de la galactokinase dans l'un et l'autre cas.

(a) L'infection de bactéries sensibles Gal⁻ (ce symbole désignera toujours ici des bactéries dépourvues d'activité de la galactokinase) par les phages transducteurs λ Gal⁺ d'un lysat HFT restaure très rapidement la synthèse de l'enzyme dans ces cellules (Fig. 1). En présence de D-fucose inducteur (courbe (A)) l'activité de l'enzyme est décelable moins de 10 minutes après la remise en culture des bactéries infectées. La synthèse se poursuit jusqu'à la lyse bactérienne (les déterminations d'activité de la galactokinase n'ont plus de sens lorsque la lyse est commencée: on observe en général une diminution progressive et irrégulière de l'activité, imputable selon toute vraisemblance à l'inactivation d'une partie de l'enzyme libérée dans le milieu). Une cinétique semblable a été décrite par Starlinger (1963) pour des cellules cultivées en milieu galactosé.

Lorsque l'on étudie la cinétique de synthèse en absence d'inducteur (courbe (B)), on remarque que la biosynthèse de galactokinase débute à un taux plus faible†

† Les résultats rapportés dans une précédente publication (Buttin, 1961) faisaient ressortir un effet moins net de l'addition d'inducteur sur la cinétique initiale de synthèse. Cette différence est due à une incapacité de la souche Gal⁻¹⁻² alors utilisée à concentrer l'inducteur. (Les clones hétérogénètes obtenus à partir de cette souche ne sont que très partiellement induits par le fucose 10⁻³ M qui est saturant pour les souches sauvages.)

mais, dans la seconde moitié de la période latente du développement du phage, elle atteint un taux comparable à celui qui s'observe en présence d'inducteur: le gène K^+ s'exprime alors de façon constitutive.

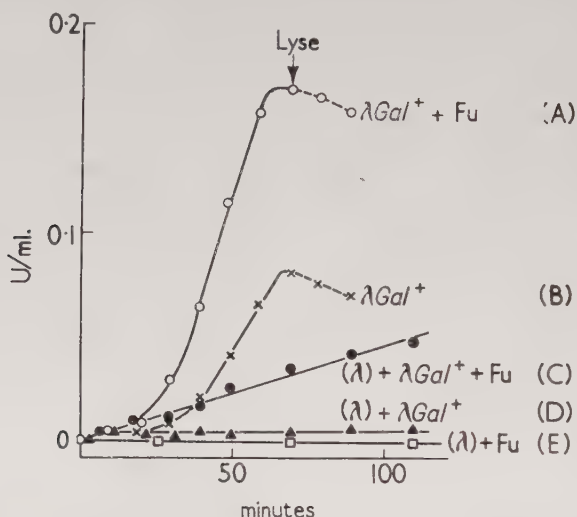


FIG. 1. Synthèse de galactokinase consécutive à l'infection de bactéries Gal^- par les phages Gal^+ d'un lysat HFT. Souches bactériennes 138-1 et 138-1(λ) cette dernière notée: (λ). Lysat E60B (multiplicité d'infection: environ 0.5 phage λ /bactérie). Du fucose 10^{-3} M était présent au temps 0 dans les cultures notées (+Fu). Courbe (E): souche 138-1(λ) non infectée, cultivée en présence d'inducteur. Ordonnée du point 0 (U/ml.): bruit de fond dans les mesures de radioactivité.

(b) Si l'on induit le prophage λGal^+ en soumettant aux rayons u.v., des bactéries hétérogénètes normales $Gal^- (\lambda) (\lambda Gal^+)$, on observe de nouveau que la synthèse de galactokinase, au cours de la seconde moitié de la période latente qui précède la lyse de ces cellules, est constitutive: l'accroissement d'activité enzymatique est de 7 à 20 fois supérieur à celui des bactéries non irradiées pendant le même intervalle de temps (Fig. 2) et l'addition d'inducteur n'augmente pas notablement la quantité d'enzyme formée pendant cette période (Fig. 9—courbes notées O).

(c) Ces expériences révèlent que le développement végétatif du phage λGal^+ s'accompagne d'une synthèse constitutive de galactokinase; il est possible de vérifier que ce phénomène est conditionné par la dérégulation des fonctions virales; lorsque l'on infecte des bactéries lysogènes $Gal^- (\lambda)$ par les phages λGal^+ d'un lysat HFT, le développement des particules surinfectantes est rendu impossible par l'immunité spécifique qui résulte de la présence du prophage (Jacob, 1954). La cinétique de synthèse de la galactokinase (Fig. 1—courbes (C) et (D)) est alors très différente de celle qui a été décrite dans le cas de bactéries sensibles (bien qu'aucune différence n'ait été décelée entre la souche sensible et la souche lysogène utilisées dans ces expériences, en ce qui concerne l'adsorption des phages); le fucose induit une synthèse (d'apparence linéaire pendant la durée de l'expérience) dont le taux est 10 fois inférieur au taux maximal observable chez les cellules sensibles infectées et cultivées dans les mêmes conditions; mais en absence d'inducteur le taux de synthèse de l'enzyme n'est pas mesurable après 110 minutes de culture: l'expression du gène K^+ reste donc conditionnée par l'adjonction d'inducteur, au moins dans la même mesure que chez les cellules sauvages.

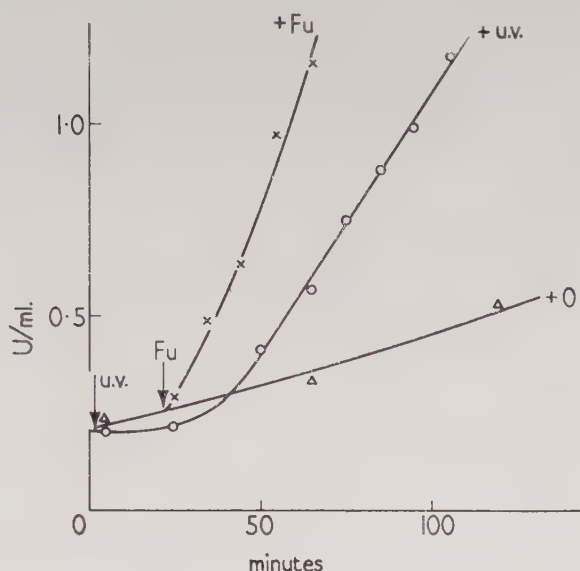


FIG. 2. Synthèse constitutive de galactokinase suivant l'irradiation (+u.v.) d'une souche hétérozygote normale. Souche B34-5(λ)(λ Gal⁺). Dans l'un des deux témoins non irradiés, du fucose 10^{-3} M (+Fu) a été ajouté à la 25^e min de culture.

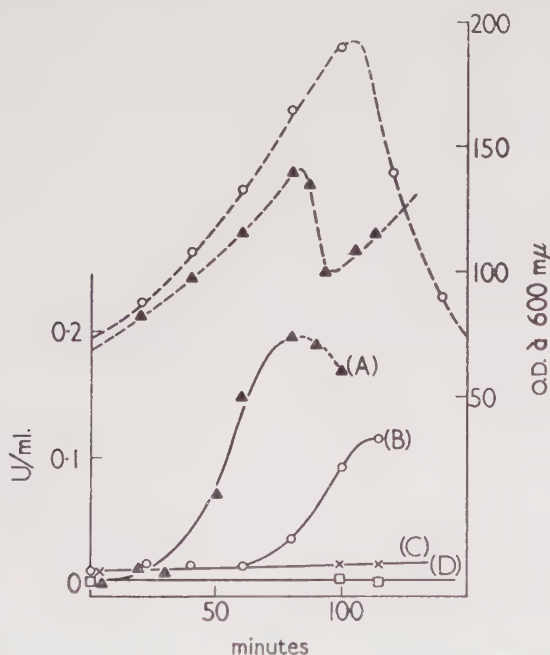


FIG. 3. Influence de l'induction du prophage λ sur l'expression d'un déterminant K⁺ associé à une particule transductrice λ Gal⁺ surinfectante.

Courbe (A): synthèse de galactokinase dans les cellules de la souche témoin sensible 138-1, infectée par les phages du lysat HFT E60B (m.i.: environ 1 phage λ /bact.).

Courbes (B) et (C) cinétique de synthèse relative à la souche 138-1(λ) surinfectée à même multiplicité par les phages de ce lysat: courbe (B), après irradiation (imposée au temps 0) des "complexes" phage-bactérie; courbe (C), sans irradiation.

Courbe (D): activité de l'enzyme dans la souche 138-1(λ) non surinfectée.

En traits interrompus: courbes de croissance des suspensions: 138-1, infectée (Δ - - Δ - - Δ), 138-1(λ), surinfectée et irradiée ($\circ$ - - $\circ$ - - $\circ$).

La biosynthèse constitutive de galactokinase est par contre restaurée dans les cellules lysogènes surinfectées si on induit le prophage (Fig. 3). La "dérépression" de la synthèse d'enzyme se produit alors 30 minutes environ plus tard que lors de l'infection de cellules sensibles. On ne saurait manquer de rapprocher ce décalage de l'observation que la lyse des cellules, lorsqu'elle résulte de l'induction d'un prophage a lieu elle-même 20 à 30 minutes plus tard qu'après l'infection de cellules sensibles. L'induction par les rayons u.v. introduit en effet dans la période latente du développement du phage une phase supplémentaire initiale pendant laquelle les effets de l'agent inducteur demeurent entièrement réversibles (Jacob, 1954). La synthèse constitutive se révèle donc bien *conditionnée par le développement végétatif du phage* et exige vraisemblablement l'accomplissement de réactions appartenant à la phase irréversible de ce cycle de développement. Le fait que la synthèse constitutive de galactokinase provoquée par l'induction du prophage λGal^+ ne s'observe que pendant la seconde moitié de la période latente est en accord avec cette interprétation.

(B) *Les hypothèses d'une induction interne ou d'une carence en répresseur sont insuffisantes pour rendre compte de la synthèse constitutive*

Si on recherche les causes possibles de la synthèse constitutive d'enzyme, il semble raisonnable d'envisager en premier lieu l'intervention d'un galactoside inducteur qui pourrait être formé au cours de réactions métaboliques liées au développement du phage: la production d'endolysine, susceptible de libérer des galactosides à partir des parois bactériennes au cours de la seconde moitié de la période latente, rend en effet cette hypothèse particulièrement vraisemblable.† Nous avons recherché si le phénomène de "dérépression" s'observait dans d'autres situations où s'accomplit le cycle complet d'expression des déterminants viraux et la lyse des cellules.

Des bactéries sensibles sauvages ont été infectées par λ (multiplicité d'infection: env. 2 phages/bact.). Cette infection ne provoque pas de synthèse constitutive de galactokinase (Fig. 4). L'activité de l'enzyme induite, dans les cellules infectées, est au contraire fortement réduite. Le fait qu'aucune "dérépression" ne s'observe dans cette expérience ne saurait être attribué à l'établissement précoce de l'état d'immunité dans les cellules infectées par le phage sauvage λ : en effet, l'irradiation des "complexes" phage infectieux-bactérie ne restaure pas la synthèse constitutive; de même l'infection par le mutant λ_c (qui ne lysogénise pas) provoque la lyse de l'ensemble de la population cellulaire et réduit le taux de synthèse dans les cellules infectées: l'activité spécifique de l'enzyme, mesurée au début de la lyse, était réduite de plus de 60% chez des cellules sauvages induites qui avaient été infectées à la multiplicité de 5 phages λ_c par bactérie. Il paraît alors exclus que la synthèse constitutive observée au cours de la période latente du développement de λGal^+ ait pour cause l'inactivation du répresseur

† On sait d'autre part que, dans les cellules non infectées de la souche 138-1 utilisée pour l'expérience d'infection précédemment décrite, la synthèse de transférase a été trouvée constitutive (Buttin, 1963) et cette propriété résulte selon toute vraisemblance de l'intervention d'un inducteur endogène, substrat de la galactokinase (Jordan, Yarmolinsky & Kalekar, 1962; Buttin, 1963). Cette situation n'interfère pas sensiblement avec le phénomène étudié: en effet, l'expression du gène K^+ associé aux particules surinfectantes est réprimée de façon pratiquement immédiate au cours de l'infection de la souche 138-1 (λ), bien que la lysogénisation par λ n'affecte pas la synthèse constitutive de transférase dans les cellules K^- (Yarmolinsky & Wiesmayer, 1960); de plus, la biosynthèse constitutive de galactokinase dans les cellules sensibles est un phénomène tardif; il semble que dans les conditions des expériences d'infection l'inducteur endogène soit présent en quantités suffisamment faibles pour être inactivé dès la formation des premières molécules de galactokinase.

cytoplasmique par un inducteur interne.† Pour la même raison, il semble permis d'écarter l'hypothèse d'une dérégulation par carence en répresseur spécifique du système *Gal*: il est possible que l'activité du gène régulateur soit affectée par le développement du phage, puisqu'il a été observé que l'expression de différents gènes bactériens est progressivement réduite au cours de la période latente du

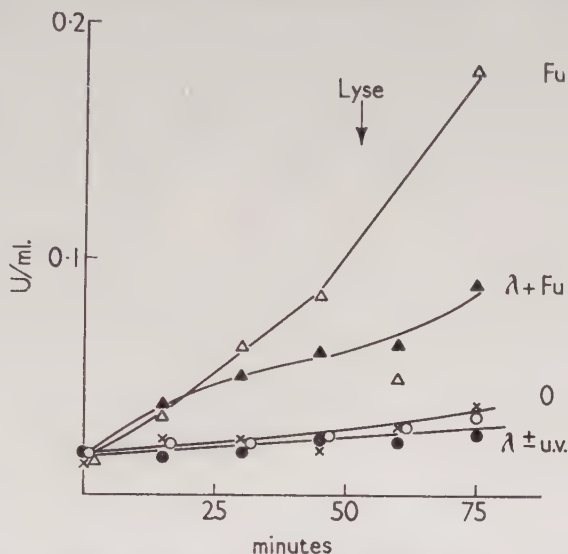


FIG. 4. Influence du développement de λ infectieux (courbes notées; $+\lambda$) sur la synthèse de galactokinase par la souche C600. Les cultures notées ($+\text{Fu}$) sont effectuées en présence de fucose 10^{-3} M. La courbe notée ($\lambda + u.v.$) correspond à une suspension infectée puis irradiée avant d'être replacée dans des conditions normales de culture. Cette courbe est indiscernable de celle ($\lambda - u.v.$) qui exprime l'activité d'une culture infectée non irradiée.

développement de λ (Siminovitch & Jacob, 1952; Starlinger, 1963); mais, comme nous venons de le montrer, l'expression des gènes *Gal*, dans leur localisation chromosomique normale, est en définitive réduite: l'expression constitutive du déterminant bactérien pendant le développement du phage résulte donc en quelque façon de son association avec le génome du phage.

(C) Analyse des facteurs topologiques conditionnant la synthèse constitutive

La conclusion précédente suggère que la synthèse constitutive de galactokinase pourrait être conditionnée par la recombinaison entre le génome bactérien et le génome viral qui est à l'origine des particules hybrides λGal . La question se posait donc de savoir si l'association réalisée entre ces génomes au stade prophage avait ou non une influence sur le taux de synthèse de la galactokinase au cours du développement du prophage. La réponse est positive: l'induction d'un prophage λ de type sauvage lysogénisant une bactérie de génotype sauvage pour le système d'utilisation de la galactose (souche Y10) provoque, au cours de la seconde moitié de la période latente, une synthèse constitutive de galactokinase (Tableau 1, et Fig. 8: souche C600(λ)). Le taux de cette synthèse apparaît en moyenne plus réduit que lors de

† L'observation récemment rapportée par Yarmolinsky (1963) selon laquelle le phénomène de dérégulation (étudié dans le cas de l'épimérase) n'est pas affecté par l'addition d'un inhibiteur de l'induction (thiométhyl β -D-galactoside) vérifie entièrement cette conclusion.

l'irradiation d'une souche hétérogénote; les accroissements d'activité enzymatique ont été trouvés, selon l'expérience (souche Y10) de 3 à 10 fois supérieurs à ceux des cultures-témoins non irradiées. Nous avons cherché à préciser les conditions topologiques indispensables à la "dérépression" de la synthèse de galactokinase.

(i) L'existence d'un système de F-duction (transfert par l'épisme sexuel F) du segment chromosomique comprenant les déterminants *Gal* et le prophage λ (Jacob, Schaeffer & Wollman, 1960) a permis de rechercher l'effet de l'irradiation sur la synthèse de la galactokinase dans des cellules chez lesquelles le déterminant K^+ et le prophage λ étaient soit en position "cis", soit en position "trans", ce qui correspond respectivement aux génotypes $Gal^-(\lambda)/Fgal^+$ et $Gal^-/Fgal^+(\lambda)$ (voir Matériel et Méthodes). Les résultats d'une de ces expériences ont été rapportés dans la Fig. 5:

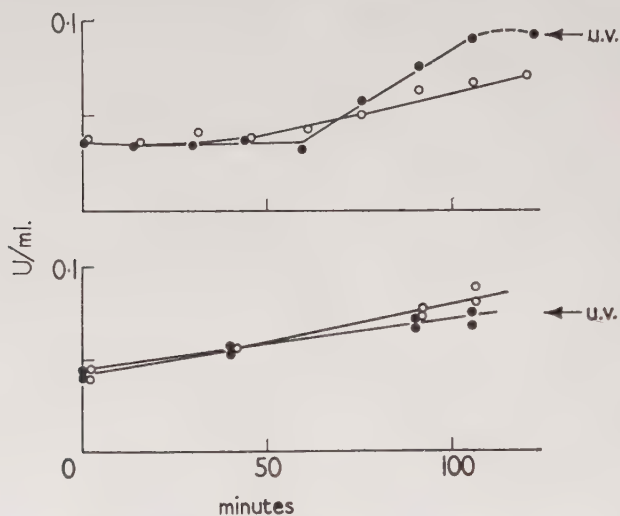


Fig. 5. *Activité de la galactokinase dans des suspensions de bactéries Gal⁻/Fgal⁺(λ): Fig. supérieure; et Gal⁻(λ)/Fgal⁺: Fig. inférieure.* Courbes notées: (u.v.): suspensions irradiées au temps 0. Début de la lyse dans l'une et l'autre cultures irradiées après 90 à 100 min.

une synthèse constitutive de galactokinase n'a été observée que lorsqu'était réalisée sur une même structure chromosomique l'association du déterminant K^+ et du prophage.

(ii) On sait qu'un court segment chromosomique comporte, à une distance croissante du segment *Gal* et dans cet ordre, les récepteurs spécifiques des prophages 82, et 434, et à une distance notablement supérieure le récepteur du prophage 21 (Jacob & Wollman, 1957). La synthèse constitutive de galactokinase a été recherchée chez des bactéries lysogénisées par ces différents prophages, après irradiation des suspensions cellulaires par une même dose de rayonnement u.v. Les résultats rapportés dans le Tableau 1 indiquent sans ambiguïté que la biosynthèse de galactokinase est partiellement déréprimée à la suite de l'induction du prophage 434, alors qu'aucune dérépression ne s'observe lors de l'induction du prophage 21 dont les propriétés immunologiques et génétiques sont cependant voisines de celles de λ (Kaiser & Jacob, 1957). L'effet de "dérépression" n'est donc pas strictement spécifique de λ mais il n'est provoqué, semble-t-il, que par des phages dont la localisation chromosomique est voisine du segment *Gal*.

Comme l'ont montré Yarmolinsky & Wiesmayer (1960), la biosynthèse de transférase est également déréprimée chez les souches $Gal^+(\lambda)$ irradiées; et un accroissement du taux de synthèse de la transférase a été observé à la suite de l'induction des prophages 82 et 434, alors que l'induction du prophage 21 se révélait sans effet.

TABLEAU 1

Activité spécifique de la galactokinase mesurée au terme de la période latente de développement du phage chez des bactéries lysogènes irradiées

Souche	Activité spécifique†‡§
C600(λ)	4.0
C600(434)	2.5
C600(21)	0.8
C600: témoin non lysogène	0.8

† Activités rapportées à l'activité spécifique de chaque culture-témoin non irradiée, au même instant; ‡ pour chaque souche valeur maximale observée à la suite de deux expériences indépendantes; § mesurée 100 min après l'irradiation sauf dans le cas de C600(434): 130 min. La croissance et la lyse des cellules étaient suivies à l'aide de prélèvements effectués de 15 en 15 min; la lyse était pratiquement totale pour les trois cultures lysogènes, mais retardée de 30 min environ dans le cas de C600(434). Il n'a pas été possible, dans la même série d'expériences, d'obtenir l'induction significative du phage 82.

L'expression constitutive des déterminants Gal apparaît donc conditionnée par l'association préalable de ces déterminants et d'un génome phagique en une même unité structurale, génome phagique hybridé ou association prophage-chromosome; et dans le dernier cas par une proximité suffisante des déterminants bactériens et du génome viral.

(D) *La synthèse constitutive de galactokinase ne semble pas résulter d'une réplication des gènes Gal*

Si l'on recherche par quel mécanisme l'association des gènes *Gal* et du génome du phage aboutit à une synthèse constitutive des protéines "bactériennes", on ne pourrait manquer de remarquer que le génome viral constitue une unité autonome de réplication produisant un nombre élevé de "copies" au cours de son cycle de développement; l'existence des particules λGal témoigne d'autre part de ce qu'une réplication simultanée des gènes *Gal* et du génome viral a lieu dans certaines circonstances. La question se pose donc de savoir si une telle réplication, en élevant le nombre des "copies" des déterminants *Gal* dans une cellule, peut être à l'origine de la synthèse de galactokinase observée pendant la période latente. L'influence d'une multiplication des déterminants *Gal* doit être envisagée sous différentes formes que nous rendrons successivement en considération.

L'accroissement d'activité de la galactokinase traduit essentiellement une dérépression de la synthèse d'enzyme

Il a été vérifié qu'un accroissement du nombre de déterminants K^+ dans une cellule détermine un accroissement du taux de synthèse de la galactokinase: l'activité de base dans une cellule diploïde est sensiblement doublée (Horowitz & Novick, 1962). Il est vraisemblable que la réplication des génomes λGal^+ qui suit l'irradiation d'une souche hétérogénote normale $Gal^-(\lambda)(\lambda Gal^+)$ produirait un nombre de copies du gène K^+ théoriquement suffisant pour élever le taux de synthèse à la valeur qui

s'observe dans ces conditions, même en supposant conservée une efficacité totale du système de régulation. Cependant il paraît exclus que la synthèse de galactokinase qui accompagne le développement du phage dépende d'un tel processus de multiplication.

(a) Ce modèle prévoit en effet que l'addition d'inducteur augmenterait l'efficacité de transcription de chaque copie de l'opéron galactose: l'incapacité du fucose à accroître la synthèse d'enzyme dans les bactéries hétérogénètes irradiées permet en réalité de définir la synthèse comme "constitutive", au sens strict du terme.

(b) Dans cette hypothèse, l'accroissement du taux de synthèse ne devrait évidemment s'observer que chez des bactéries qui répliquent activement le génome phagique. Le phage transducteur ne se multipliant pas sans la coopération d'un génome complémentaire pour la séquence génétique correspondant à son défaut (Arber, 1958). L'induction du prophage dans une souche hétérogénète déficiente *Gal*⁻(λ *Gal*⁺) ne devrait pas élever sensiblement le taux de synthèse de l'enzyme: nous avons observé en réalité des accroissements de 40 fois la valeur de base (Tableau 2). Il est peu

TABLEAU 2
*Dérépression de la synthèse de galactokinase consécutive
à l'induction d'un prophage λ Gal⁺†*

Souche	Accroissement d'activité enzymatique entre 0 et 100 min‡ (U $\times 10^3$ /ml.)					
	Cultures non irradiées			Cultures irradiées		
	Non induites (Δ_{NI})	Induites (Δ_I)§	$\frac{\Delta_I}{\Delta_{NI}}$	Non induites (Δ_{NI})	Induites (Δ_I)	$\frac{\Delta_I}{\Delta_{NI}}$
<i>Gal</i> ⁻¹⁻² (λ)(λ <i>Gal</i> ⁺)	10	92	9.2	222	185	0.8
<i>Gal</i> ⁻¹⁻² (λ <i>Gal</i> ⁺)	13	133	10	401	415	1.0

† Extrait de: Buttin, Jacob & Monod (1960); ‡ durée correspondant à la période latente du développement du phage; § inducteur: D-fucose 5×10^{-3} M; cette concentration d'inducteur peut ne pas être entièrement saturante pour les clones isolés après transduction de la souche *Gal*⁻¹⁻².

vraisemblable qu'une multiplication semblable des copies des gènes *Gal* n'ait pas été détectée lors des expériences qui ont conclu à la nécessité d'une coopération génétique pour la multiplication du génome λ *Gal*.

(c) Il convient de mentionner que le développement simultané d'un prophage λ *Gal*⁺ et d'un prophage sauvage λ aboutit en fait à la production d'une quantité d'enzyme moindre que le développement du seul prophage déficient. Il semble, comme l'a récemment discuté Starlinger (1963) que l'expression d'un seul génome phagique suffise à saturer les possibilités de synthèse protéique de la cellule-hôte; et que l'assistance fournie par le phage sauvage pour la multiplication du génome λ *Gal* ne suffise pas à compenser les effets d'une compétition qui s'instaure entre les deux génomes.

Le terme d'"effet de dérépression" par lequel le phénomène a été occasionnellement désigné dans les paragraphes précédents apparaît donc ici pleinement justifié: il est clair que l'activité enzymatique ne représente pas la somme d'activités de base correspondant à l'expression "réprimée" d'un nombre suffisant de déterminants *K*⁺.

Nous avons cherché à préciser si l'accroissement du taux de synthèse pendant la période latente pouvait raisonnablement s'interpréter par la seule hypothèse d'une

dérépression, en absence de toute multiplication. Dans ce but, l'expression du déterminant K^+ associé au génome viral a été étudiée dans des conditions où une mutation supprime déjà (et presque complètement, semble-t-il) l'activité du système régulateur bactérien.

L'irradiation d'une souche hétérogénote normale $Gal^-(\lambda Gal^+ O^c gal)(\lambda)$ aboutit à la lyse des cellules sans provoquer d'accroissement du taux de synthèse qui demeure à tout instant égal ou inférieur à celui de la culture-témoin non irradiée. Dans les cellules hétérogénotes défectives $Gal^-(\lambda Gal^+ O^c gal)$ irradiées, il a été observé un accroissement du taux de synthèse au cours de la seconde moitié de la période latente, sans toutefois que la quantité totale d'enzyme synthétisée pendant cette période excède le double de celle qui se formait dans les cellules-témoins. Les conséquences de l'induction du prophage ont été également observées chez des souches constitutives de génotype R^-gal , lysogènes et hétérogénotes. A la suite de l'induction du prophage λGal^+ , le taux de synthèse d'enzyme était approximativement doublé dans les cellules hétérogénotes défectives (Fig. 6). Aucun accroissement de la synthèse n'était

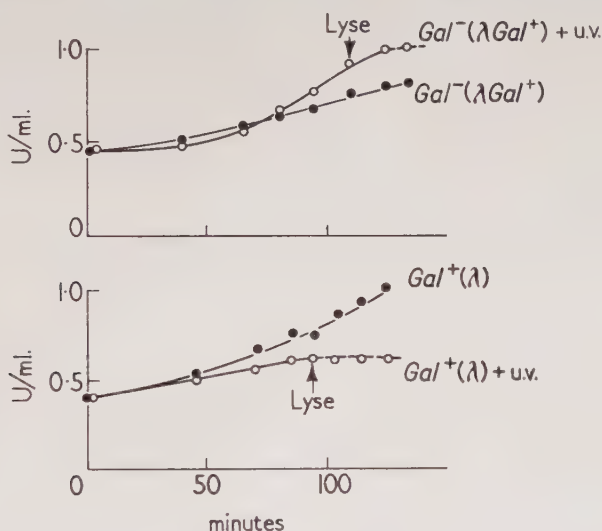


FIG. 6. Activités de la galactokinase dans des cultures de bactéries hétérogénotes défectives $Gal^-R^-gal(\lambda Gal^+)$: Fig. supérieure; et lysogènes $Gal^+R^-gal(\lambda)$: Fig. inférieure. Courbes notées: u.v.: suspensions irradiées au temps 0. Souches B170-A(λGal^+) et B78A(λ).

décelable après irradiation de la souche hétérogénote normale, ou des cellules Gal^+ lysogénisées par le prophage λ (Fig. 6); la confrontation de ces résultats avec ceux qui ont été obtenus à la suite de l'irradiation de souches inductibles (Tableau 3) montre sans ambiguïté que le développement du phage n'accroît de façon vraiment importante la synthèse d'enzyme que dans les cellules où une répression efficace s'exerce sur la transcription des gènes de l'opéron *Galactose*, confirmant ainsi que la dérégulation des fonctions virales a bien pour principal effet une dérégulation des synthèses bactériennes qui dépendent de déterminants associés au génome phagique. On vérifie également que la présence d'un prophage de type sauvage réduit systématiquement, pendant la période latente, la synthèse de galactokinase gouvernée par le phage transducteur. Enfin le taux de synthèse de l'enzyme, dans une cellule génétiquement constitutive qui est le siège du développement du seul génome λGal , se révèle

TABLEAU 3

Influence de l'induction du prophage sur l'activité spécifique de la galactokinase dans des souches lysogènes et hétérogénètes inductibles et constitutives

Souches	Génotypes	Activité spécifique (U/mg)		Rapport
		- u.v.	+ u.v.	$\frac{+ u.v.}{- u.v.}$
C600(λ)	$Gal^+O^+galR^+gal$	1.4	3.5	2.5
B78A(λ)	$Gal^+O^+galR^-gal$	11	9.8	0.9
$Gal^{-1-2}(\lambda Gal^+)$	$Gal^-O^+galR^+gal(\lambda Gal^+O^+gal)$	0.7	12	17
B170-A(λGal^+)	$Gal^-O^+galR^-gal(\lambda Gal^+O^+gal)$	14	16.6	1.2
B170-A(λ)(λGal^+)	$Gal^-O^+galR^-gal(\lambda Gal^+O^+gal)(\lambda)$	8.5	8.0	0.9
132-1(λGal^+O^cgal)	$Gal^-O^cgalR^+gal(\lambda Gal^+O^cgal)$	14	17.2	1.2
132-1(λ)(λGal^+O^cgal)	$Gal^-O^cgalR^+gal(\lambda Gal^+O^cgal)(\lambda)$	13.2	13.0	1

Les activités ont été déterminées au début de la lyse des cellules irradiées et au même instant dans les cultures-témoins. Les résultats relatifs aux différentes souches sont extraits d'expériences indépendantes; les activités spécifiques ont été calculées pour la masse bactérienne totale, et ne sont pas corrigées pour la présence des cellules Gal^- ségréguées par les clones hétérogénètes.

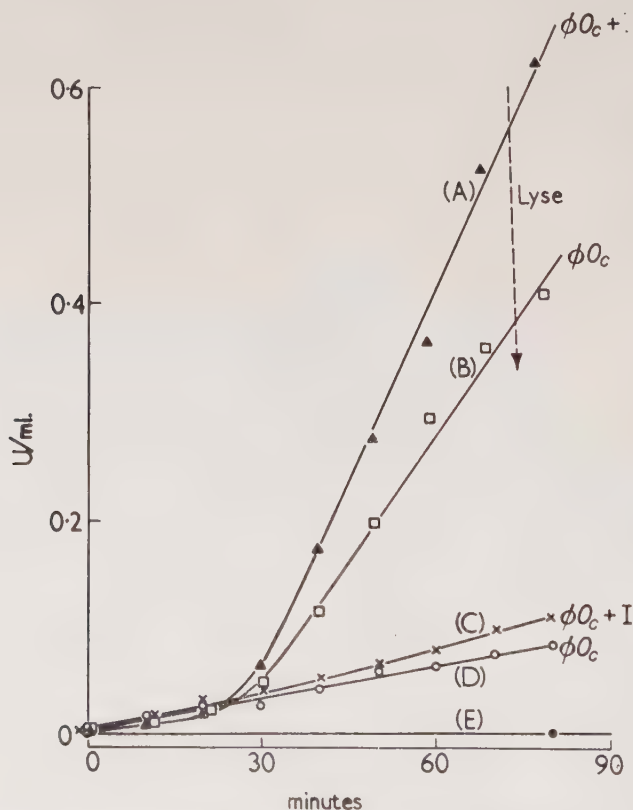


FIG. 7. Synthèse de galactokinase consécutive à l'infection de bactéries Gal^- par les phages λGal^+O^cgal d'un lysat HFT. Lysat C173 (m.i.: environ 0.4 phage λ /bact.). Courbes (A) et (B): souche réceptrice sensible 132-1; courbes (C) et (D): souche réceptrice lysogène 132-1(λ). Courbes notées (+I): cultures effectuées en présence d'inducteur (fucose 10^{-3} M). Courbe (E): activité enzymatique de la souche 132-1(λ) non infectée. Ordonnée du point 0 (U/ml.): bruit de fond des mesures de radioactivité.

ablement supérieur à celui qui s'observe lorsque le génome viral est au stade prophage: cet accroissement très limité ni n'impose ni ne permet d'exclure l'hypothèse d'un début de multiplication des déterminants *Gal*.

Nous avons également recherché dans quelle mesure la synthèse d'enzyme gouvernée par un génome $\lambda Gal^+ O^c gal$ infectieux est réduite dans une cellule où le développement du phage est bloqué par l'immunité spécifique contre λ . Les résultats d'une expérience de ce type sont rapportés Fig. 7. Dans une souche lysogène comme dans une souche sensible, le déterminant K^+ associé au phage $\lambda Gal^+ O^c gal$ s'exprime constitutivement; ce résultat témoigne de ce qu'en toutes circonstances, l'opéron $Gal^+ O^c gal$ demeure presque insensible au système de régulation bactérien. Le taux de synthèse est alors selon l'expérience de 8 à 10 fois plus élevé dans la souche sensible. Cette différence est supérieure à celle qui apparaissait lorsque l'immunité était levée par induction du prophage $\lambda Gal^+ O^c gal$: l'expression d'un gène de l'opéron $Gal^+ O^c gal$ ne paraît donc pas affectée au même degré par l'immunité virale selon que l'influence de celle-ci est étudiée chez un phage surinfectant ou chez un prophage. Tout se passe comme si la transcription des gènes *Gal* associés au phage surinfectant était plus réduite que lorsque ce phage a lui-même réalisé avec le chromosome bactérien l'association caractéristique du stade prophage. On peut envisager plus simplement que l'irradiation réduit de façon non spécifique la capacité de synthèse de la bactérie et limite ainsi le taux maximal de synthèse de l'enzyme à une valeur inférieure à celle qui peut être atteinte dans une cellule qui n'a pas subi ce traitement, mais cette hypothèse est très peu probable: en effet l'irradiation d'une souche Gal^- sensible (souche Gal^{-1-2}) préalablement infectée par des phages $\lambda Gal^+ O^c gal$ n'a pas entraîné de réduction significative du taux de synthèse de galactokinase, mais seulement un retard de 10 minutes dans la cinétique d'expression du gène.

i) La dérèpression ne semble pas résulter d'une multiplication des gènes *Gal*

Les résultats précédents établissent que la synthèse constitutive traduit principalement l'incapacité du système régulateur à réprimer efficacement la transcription de l'information génétique *Gal*. Cependant, l'observation selon laquelle il est possible d'accroître, fût-ce de façon très réduite, le taux de synthèse des bactéries hétérogénotes défectives $Gal^+ O^c gal$ ou $R^- gal$ en levant l'immunité phagique suggère qu'un début de réplication du génome défectif pourrait avoir lieu. La question se pose alors de savoir si une *réplication* très limitée des déterminants *Gal* ne pourrait pas provoquer elle-même une *dérèpression*: des résultats récemment acquis dans l'étude du système de la β -galactosidase d'*E. coli* (Ullmann-Erdös & Monod, non publié) incitent en effet à penser que le nombre de molécules d'un répresseur est en toutes circonstances très réduit; il est possible qu'il existe une relation presque stoechiométrique entre le nombre de copies de l'opérateur et celui des molécules de répresseur spécifique au cours de la croissance cellulaire. S'il en est ainsi, un accroissement, même très restreint, du nombre des copies de l'opéron *galactose* pourrait rompre cet équilibre et amplifier considérablement l'effet de la multiplication du gène sur le taux de synthèse de l'enzyme. Cette interprétation serait peut-être compatible avec une réplication du génome λGal^+ suffisamment restreinte pour ne pas avoir été décelée dans des expériences de complémentarité génétique fonctionnelle. Cependant, comme nous le montrerons, plusieurs observations ne sont pas favorables à ce modèle.

Tout porte à croire que la dérèpression que provoque l'induction du prophage Gal^+ et celle qui résulte de l'induction du prophage λ dans une cellule Gal^+ ont, au

niveau moléculaire, une même origine. Un modèle qui, dans le cas du développement du prophage λGal^+ , interprète cet effet en faisant intervenir une réplication des déterminants *Gal* suppose donc que celle-ci a lieu à une fréquence suffisante dans des bactéries lysogènes irradiées. Or, dans ces cellules, la seule preuve expérimentale que les gènes *Gal* peuvent être associés à la réplication virale est fournie par la mise en évidence de rares particules λGal : seule, une cellule lysogène parmi 10^4 environ libère des phages transducteurs (Fraser, 1962); l'effet de dérépression, au contraire, concerne nécessairement une fraction importante, sinon la totalité de la population cellulaire: le taux de synthèse constitutive représente en effet au moins le quart de celui que détermine l'irradiation d'une souche hétérogénote normale $Gal^-(\lambda Gal^+)(\lambda)$. Les particules λGal^+ décelées dans les lysats ne peuvent donc absolument pas rendre compte de l'effet observé. Il convient de rappeler également qu'une dérépression très significative fait suite à l'induction du prophage 434, alors que la très basse fréquence des particules transductrices dans les lysats de ce phage (Reissig & Wollman, non publié) n'atteste que beaucoup plus rarement encore d'une réplication simultanée des déterminants *Gal* et du génome phagique. Il est plus difficile par contre d'exclure l'éventualité d'une réplication qui produirait des copies hybrides, non décelables en tant que génome d'un phage transducteur. Si une recombinaison génétique particulière conditionne la formation des génomes hybrides λGal , il n'est certes pas vraisemblable qu'elle ait lieu dans plus de 25% des cellules ni d'ailleurs que les génomes λGal auxquels elle est supposée donner naissance soient indétectables. Mais un modèle a été proposé (Campbell, 1962) qui décrit un mode de formation des génomes λGal ne faisant pas intervenir de recombinaison génétique autre que l'insertion initiale de tout prophage λ dans le chromosome. Dans ce modèle qui décrit les séquences génétiques λ et *Gal* comme colinéaires† il est difficile d'apprécier avec quelle fréquence la réplication du génome λ pourrait s'étendre à une séquence génétique adjacente, incluant les déterminants *Gal*; et il demeure concevable que de telles copies hybrides ne puissent être qu'exceptionnellement incluses dans une enveloppe phagique. Il serait donc particulièrement souhaitable de pouvoir déterminer avec précision le rôle de la multiplication du génome sauvage λ dans le phénomène de dérépression. Deux types d'expériences ont été réalisés dans ce but.

(a) *Etude de souches lysogènes défectives*. Divers mutants du phage λ sont connus chez lesquels un défaut génétique supprime l'une des fonctions virales. Il a été clairement établi par Jacob *et al.* (1957) que certains de ces mutants sont incapables d'effectuer une multiplication végétative normale de leur génome: il convenait donc de rechercher si l'effet de dérépression s'observe lors de l'induction des prophages correspondants. De plus, l'étude des mutants défectifs a permis à ces auteurs de reconnaître plusieurs étapes successives au cours du développement de λ : il semble que l'accomplissement des fonctions "tardives" du phage suppose réalisées au préalable certaines réactions ou séquences de réactions "précoces". Nous avons observé que la dérépression n'était totale que pendant la seconde moitié de la période latente, ce qui suggère qu'elle pourrait être conditionnée par l'accomplissement de certaines réactions phagiques "précoces". La question se posait donc de rechercher dans quels cas la dérépression a lieu lorsqu'on induit des prophages défectifs, dont le développement est interrompu à des stades différents. Les expériences correspondantes ont été réalisées avec les souches dont les caractéristiques ont été rappelées dans le

† Ce modèle interprète la position "interne" du segment *Gal* dans le génome λGal en cours de réplication par les propriétés d'un génome viral circulaire.

Tableau 4. Les courbes de croissance des bactéries irradiées étaient conformes aux propriétés connues des différents prophages défectifs. L'irradiation a provoqué dans chacune de ces souches une synthèse constitutive de galactokinase dont le taux était au moins équivalent à celui qui s'observe après induction du prophage sauvage dans la souche C600(λ) dont elles dérivent. Il est donc clair que des mutations qui suppriment les différentes manifestations physiologiques connues du développement du phage (multiplication du génome, synthèse d'endolysine, d'antigène bloquant, de

TABLEAU 4

Propriétés physiologiques connues† de prophages défectifs dont l'induction provoque une dérépression de la synthèse de galactokinase

Souche	Multiplication végétative du génome	Synthèse d'endolysine	Synthèse d'antigène bloquant	Synthèse de substance h	Production de particules infectieuses après surinfection par un phage normal	Lysogénisation par les particules défectives en infection simple
P14	+	+	+	—	+	—
*22‡	0	0	0	A	+	0
*30‡	0	0	+	+	+	0
*32	0	+	0	A	+	0
*34	0	+	+	0	—	—
*27	—	0	—	—	—	—

+ : accomplit le processus; 0: ne l'accomplit pas; — : non recherché; A: accomplit le processus avec l'aide d'un phage normal surinfectant.

† Extrait de: Jacob & Wollman, 1956a; Jacob *et al.*, 1957; communication personnelle de M. Jacob; ‡ Il a été observé également par Yarmolinsky (1963) que l'induction des prophages $\lambda d22$ et $\lambda d30$ déréprime la biosynthèse d'épimérase.

protéine "h") n'abolissent pas l'effet de dérépression. L'irradiation de deux souches (T5 et T11), chez lesquelles les fonctions virales sont bloquées très tôt (Jacob & Goodgal, non publié) provoque une dérépression plus limitée: la quantité d'enzyme produite entre la 50^e et la 90^e minute suivant l'irradiation n'a, au cours de plusieurs expériences, jamais été trouvée supérieure à 50% de celle que synthétise pendant la même période la souche C600(λ) et, en moyenne ne dépassait pas 20% de cette quantité. Une différence beaucoup plus importante apparaît si on compare (Fig. 8) les cinétiques de synthèse à celle d'une autre souche (P22) également affectée dans les fonctions "précoces" du phage. Chez les souches T5, T11 et P22 la synthèse se poursuit au-delà de la 90^e minute, la lyse ne se produisant pas. Mais elle est plus intense chez la souche P22 que chez la souche C600(λ), le taux de synthèse étant plus élevé même que chez la souche non lysogène C600 induite par une concentration saturante de fucose.

Il semble donc possible d'associer à des mutations dans le génome du phage des variations importantes dans l'intensité avec laquelle se manifeste l'effet de dérépression. Ces résultats ne mettent toutefois pas en évidence avec certitude de fonction virale dont l'expression serait spécifiquement indispensable à la dérépression des synthèses bactériennes. (Les variations quantitatives dans le taux de synthèse de l'enzyme peuvent en effet résulter de particularités individuelles concernant l'association des différents prophages et du chromosome bactérien; et l'observation que la suppression de certaines synthèses phagiques s'accompagne d'une synthèse accrue de galactokinase est peut-être une manifestation de la compétition qui, comme nous l'avons

évoqué, s'exerce vraisemblablement entre les diverses synthèses protéiques dans la cellule infectée.) Du moins est-il bien établi qu'une *réplication active du génome sauvage* λ n'est absolument pas nécessaire pour que l'effet de dérèpression se manifeste avec une intensité maximale.

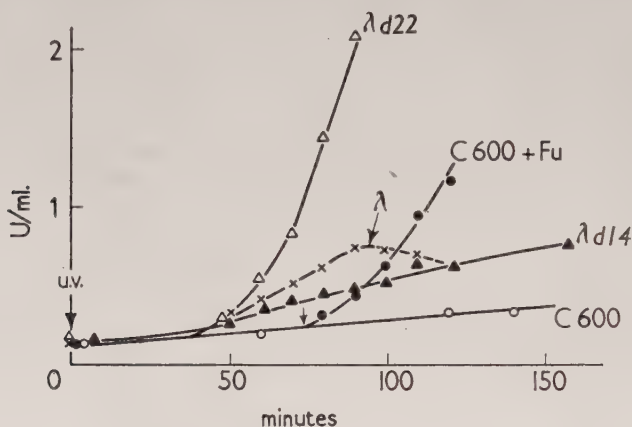


FIG. 8. *Activité de la galactokinase dans des suspensions irradiées de bactéries sensibles, lysogènes et lysogènes défectives.* Du fucose 10^{-3} M ($\downarrow$) est ajouté à une culture de la souche C600. L'activité enzymatique dans la souche C600(λ d22) au-delà de la 90^e min de culture n'a pas été rapportée, les valeurs correspondantes étant hors des limites de proportionnalité du dosage.

Dans la même expérience, l'activité de la souche C600(λ d14) était indiscernable de celle de la souche C600(λ).

(b) *Etude en présence d'un inhibiteur de la biosynthèse d'ADN.* La conclusion précédente pose évidemment de nouveau le problème de savoir si les phages défectifs reconnus (par des techniques de complémentation génétique fonctionnelle) "incapables de multiplier leur génome" ne sont pas susceptibles de produire les quelques copies hybrides qui pourraient rompre un équilibre entre répresseur et opérateurs. Nous avons donc recherché si l'effet de dérèpression se produit lorsqu'un inhibiteur de la synthèse d'ADN est présent pendant la période latente de développement du phage. Le phényléthylalcool, qui autorise une biosynthèse protéique importante en absence de toute synthèse de l'ADN (Berrah & Konetzka, 1962), a été utilisé à cette fin. Des bactéries hétérogénotes normales $Gal^-(\lambda Gal^+)(\lambda)$ ont été centrifugées, reprises en milieu synthétique à 0°C, irradiées et aussitôt remises en culture (temps 0) en présence et en absence de phényléthylalcool 0.25%. Une suspension témoin non irradiée a également été cultivée en présence et en absence de l'inhibiteur. Après 25 minutes de culture, les 4 suspensions ont été fractionnées, et une moitié de chaque culture a continué son développement en présence de fucose. Les observations suivantes ont été effectuées.

(1) Dans les cultures non irradiées, la quantité d'enzyme synthétisée en présence d'inducteur entre la 50^e et la 90^e minutes était réduite de 60% en présence de phényléthylalcool (1.1 U/ml. et 0.5 U/ml. respectivement). L'activité de base des suspensions paraît réduite dans un rapport comparable. Le taux d'induction par le fucose est supérieur à 7 dans l'une et l'autre culture.

(2) Dans les cultures irradiées, la galactokinase est synthétisée constitutivement à partir de la 40^e à 50^e minute (Fig. 9) en présence de l'inhibiteur comme en son absence. Le phényléthylalcool réduit de 50% environ la quantité d'enzyme formée

entre la 50^e et la 90^e minute. La lyse était perceptible à partir de la 80^e minute dans les cultures contenant le phényléthylalcool, de la 90^e minute dans les cultures sans inhibiteur.

(3) Les phages ont été titrés dans les surnageants des suspensions (Tableau 5). Le lysat de la culture en phényléthylalcool contenait 600 fois moins de phages que celui de la culture témoin.

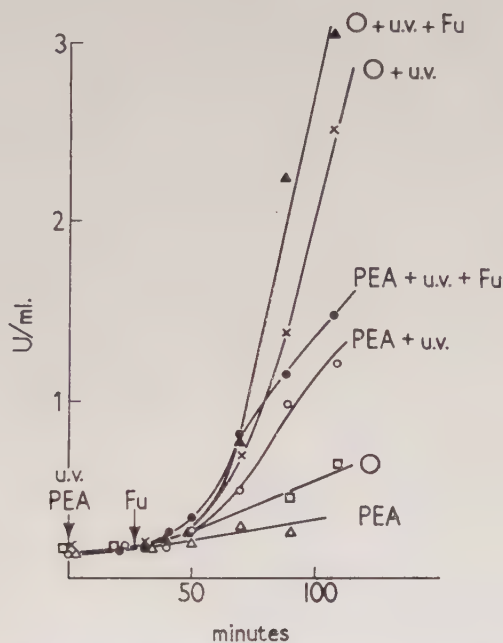


Fig. 9. Synthèse de galactokinase chez des bactéries hétérogénètes normales irradiées et influence du phényléthylalcool sur le phénomène de dérèpression. Souche B34-5(λ)(λ Gal⁺). Abréviations: Fu: fucose 10^{-3} M; PEA: phényléthylalcool 0.25%; O: culture effectuée en absence de phényléthylalcool (protocole expérimental: voir texte). De l'extrait de levure (1 g/l.) avait été incorporé au milieu 63 afin que soit maintenue une synthèse suffisamment importante de protéines en absence de PEA (Berrah & Konetzka, 1962).

TABLEAU 5

Influence de la présence de phényléthylalcool (0.25%) pendant la période latente sur le titre en phages λ d'un lysat HFT†

Induction u.v.‡	Phényléthylalcool	Phages λ /ml.
+	0	2400×10^5
+	+	3.8×10^5
0§	0	14×10^5
0	+	0.6×10^5

Conditions expérimentales: voir texte. Les lysats correspondent aux cultures effectuées en absence d'inducteur de l'expérience rapportée Fig. 9. Les suspensions ont été chloroformées après 130 à 150 min de culture suivant l'irradiation (la lyse des suspensions irradiées était achevée à cet instant), et centrifugées; † + : cellules irradiées; 0: cellules non irradiées; § les suspensions ont été débarrassées par centrifugation des phages libérés par la lyse spontanée des cellules.

La présence d'inhibiteur n'a donc eu dans cette expérience aucun effet différentiel sur la synthèse constitutive de galactokinase déclenchée par l'irradiation. La lyse des bactéries témoignant d'une biosynthèse normale des protéines virales, l'absence de phages dans le lysat paraît bien indiquer (Konetzka & Berrah, 1962) que la biosynthèse d'ADN "phagique" a—comme celle de l'ADN "bactérien"—été effectivement suspendue par l'inhibiteur. *Les résultats de cette expérience préliminaire n'encouragent donc pas plus que les observations précédentes l'hypothèse selon laquelle le processus de réplication conditionne l'effet de dérépression.*

4. Conclusions et Discussion

L'ensemble des expériences qui viennent d'être décrites imposent essentiellement la conclusion que, *pendant le développement végétatif d'un phage tempéré, l'expression de déterminants bactériens réalisant une association suffisamment étroite avec le génome viral peut échapper à la répression qu'exerce le système régulateur bactérien.* Cette observation s'applique au cas des déterminants bactériens *Gal* lorsqu'ils sont intégrés dans le génome du phage transducteur λGal ou lorsqu'ils appartiennent à un chromosome porteur du prophage λ ; l'association prophage-chromosome pouvant elle-même, comme nous l'avons rappelé, correspondre à une recombinaison d'un type particulier entre les deux génomes, il est difficile d'apprécier dans quelle mesure la distinction effectuée entre ces associations génétiques est, d'un point de vue structural, réelle et dans quelle mesure elle est artificielle. Quoi qu'il en soit, il ne paraît pas douteux que la dérépression se produit dans des conditions où l'association structurale des déterminants *Gal* avec leur opérateur de régulation est elle-même maintenue: les gènes *Gal* d'un prophage λGal^+ sont en effet soumis à une régulation normale; et, si l'on induit le développement des prophages dans une souche hétérogénote normale, $Gal-(\lambda Gal^+)(\lambda)$ la réplication du génome déficient aboutit à la formation d'une quantité importante de "copies" capables de transduire et perpétuant le caractère O^+gal (ou, le cas échéant, O^cgal) du prophage parental, ce qui semble bien attester de la permanence de l'opéron *Gal* en tant que structure indissociée pendant la période latente. Nous avons posé la question de savoir si la dérépression n'était pas précisément une manifestation de cette propriété reconnue au génome viral de répliquer dans certaines circonstances les gènes *Gal* en même temps que ceux qui lui sont propres, et d'accroître ainsi le nombre des copies de cet opéron à l'intérieur d'un même cytoplasme; cette recherche était guidée par l'hypothèse qu'un tel processus pourrait aboutir très rapidement à un déséquilibre entre le nombre des copies de l'opérateur et celui des molécules du répresseur. Le modèle était séduisant en ce qu'il offrait une interprétation simple de la dérépression, ne faisant appel qu'à des propriétés du système régulateur reconnues à la suite d'une étude expérimentale précise. Cependant, les expériences cherchant à mettre en évidence la nécessité d'une réplication du génome viral en tant que préalable à la dérépression ont eu un résultat négatif.

Il semble par conséquent plus probable que l'association des déterminants bactériens à un génome phagique en développement ait un effet direct sur les modalités de la transcription de l'information génétique qu'ils détiennent: *un tel effet, gouverné par le contexte génétique dans lequel sont situés les déterminants bactériens, ne saurait alors se concevoir qu'au niveau de la transcription primaire.*

D'un point de vue formel, sa manifestation peut signifier que l'opéron galactose est devenu, en raison de son association avec le génome de λ au stade végétatif:

(a) soit insensible au répresseur, la transcription n'étant plus affectée par la combinaison répresseur-opérateur;

(b) soit inaccessible au répresseur, la combinaison répresseur-opérateur étant devenue physiquement impossible.†

(a) Envisager qu'une combinaison du répresseur et de l'opérateur puisse ne pas être suivie d'effet revient, semble-t-il, à prendre en considération la mise en œuvre d'un système de transcription différent de celui qui préexistait dans la cellule non infectée, puisque le modèle génétique qu'il importe de transcrire apparaît lui-même changé. Il n'est pas inconcevable qu'un système enzymatique de transcription propre au phage ait un code de reconnaissance qui lui permette de s'associer avec un répresseur phagique distinct des opérateurs bactériens et, dès lors, de copier de façon continue et en échappant à toute régulation bactérienne le génome viral et une séquence bactérienne contiguë. Ce modèle rendrait compte de l'observation que l'activité d'un opéron *Galactose* constitutif (*O^{gal}*) associé au génome viral paraît brève pendant la période latente alors que les biosynthèses protéiques gouvernées par des gènes bactériens se révèlent d'une façon très générale progressivement accrues pendant le développement végétatif du phage. Il serait compatible également avec la cinétique de formation de l'enzyme; celle-ci suggère l'existence de deux phases pendant le développement de λGal^+ , la synthèse constitutive ne paraissant débiter qu'au terme d'une période initiale pendant laquelle la répression demeure effective; or on remarque que les protéines phagiques ne sont elles-mêmes synthétisées qu'au cours de la seconde moitié de la période latente, ce qui rend vraisemblable l'existence d'une acide ribonucléique-polymérase phagique dont l'intervention ne se produirait que tardivement. *La mise en œuvre d'un système de transcription phagique prenant à un instant donné le relais du système de transcription bactérien pourrait donc constituer un modèle assez satisfaisant pour expliquer l'effet de dérégulation provoqué par le développement de λ et des prophages voisins.*

(b) L'idée selon laquelle la dérégulation résulterait de l'inaccessibilité de l'opérateur au répresseur ne permet pas de formuler une hypothèse de travail aussi précise. Il convient cependant de l'envisager avec soin. Elle peut être concrétisée sous la forme d'une modification introduite localement dans l'état physique du matériel génétique: il est concevable que l'induction d'un prophage ait un effet de cette nature et même que celui-ci conditionne le développement végétatif du phage; mais l'observation que la dérégulation n'est pas immédiate retire beaucoup de crédit à ce modèle. En revanche, l'hypothèse selon laquelle la dérégulation résulterait de ce que le matériel génétique devient inaccessible au répresseur paraît posée en termes expérimentaux assez précis si l'on se reporte aux observations qui ont été effectuées à partir du système de transduction des déterminants *Lactose* par le phage (P1dl). En raison de sa relation avec l'opéron qu'il gouverne, le gène régulateur (*i*) est lui-même transductible dans ce système; on remarque alors (Revel & Luria, 1961) que la synthèse de β -galactosidase (caractère z^+), qui était partiellement dérégulée lors de l'infection d'une cellule inductible i^+z^- par un phage de génotype i^-z^+ , est répressible quel que soit le génotype de la cellule réceptrice lorsque le phage transduit l'allèle sauvage du gène régulateur au même temps que le déterminant z^+ . Il existe donc un effet de position indiscutable du gène régulateur lui-même. Le système λGal ne permet pas de vérifier si ces

† Une conclusion et une alternative analogues ont été suggérées à Revel, Luria & Young (1961) pour les propriétés du système de transduction des déterminants *lactose* par le phage P1.

conclusions s'appliquent à la régulation de la synthèse de galactokinase; la dérépression n'étant jamais que partielle dans le système *Pldl*, il est possible que l'effet de position soit imputable à la plus ou moins grande activité du gène régulateur suivant que sa transcription est assurée par un système bactérien ou viral. Mais on peut aussi remarquer que tout se passe comme si les synthèses gouvernées par le génome viral et par les gènes qui lui sont topologiquement associés se poursuivaient indépendamment des synthèses gouvernées par le reste du génome bactérien, et rapprocher cette situation d'observations récentes, effectuées chez des Champignons dicaryotes: la biosynthèse d'enzymes inductibles paraît soumise chez ces organismes à l'activité d'un circuit régulateur dont l'efficacité serait strictement conditionnée par l'association de ses éléments au sein d'un même noyau (Pontecorvo, citation dans Roberts, 1963); il est tentant d'envisager que la cellule infectée puisse devenir l'équivalent d'une cellule dicaryote dans laquelle chaque "noyau" gouvernerait indépendamment ses propres synthèses. Toutefois rien ne permet actuellement de dire si cette notion de "cloisonnement fonctionnel" a quelque réalité physique dans la cellule bactérienne infectée par un phage.

Il n'est donc pas possible dans l'état actuel des observations expérimentales d'exclure l'un ou l'autre des deux modèles que nous venons d'envisager. Mais chacun d'eux comporte ses propres prévisions qu'une étude expérimentale ultérieure devrait permettre d'éprouver: en particulier, le premier modèle devrait conduire à la mise en évidence d'une activité enzymatique particulière mais, contrairement au second, il n'exige pas formellement que la biosynthèse des enzymes du métabolisme du galactose reste soumise, après induction de λ , à la même règle de coordination que dans la cellule non infectée. Quoi qu'il en soit, l'"effet de dérépression" du système *Gal* constitue un exemple précis de démasquage de potentialités génétiques opéré par un virus chez son hôte, et l'on peut espérer que son analyse apportera une contribution appréciable à la compréhension des processus par lesquels certains virus oncogènes provoquent le dérèglement des biosynthèses de la cellule qu'ils parasitent.

L'auteur exprime sa profonde reconnaissance au Professeur J. Monod et à F. Jacob qui ont guidé ses recherches. Cette étude a bénéficié du soutien du "Jane Coffin Childs Memorial Fund", du "National Institute of Health", du Commissariat à l'Energie atomique et de la Délégation générale à la Recherche scientifique.

REFERENCES

- Adams, M. H. (1950). In *Methods in Medical Research*, vol. 2, p. 1. Chicago: The Year Book Publishers.
- Arber, W. (1958). *Arch. Sci., Genève*, **11**, 259.
- Arber, W., Kellenberger, G. & Weigle, J. (1957). *Schweiz. 2 allgem. Pathol. Bakteriolog.* **20**, 659.
- Berrah, G. & Konetzka, W. A. (1962). *J. Bact.* **83**, 738.
- Buttin, G. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 213.
- Buttin, G. (1963). *J. Mol. Biol.* **7**, 183.
- Buttin, G., Jacob, F. & Monod, J. (1960). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **250**, 2471.
- Campbell, A. M. (1959). *Virology*, **9**, 293.
- Campbell, A. M. (1962). In *Advances in Genetics*, vol. 11, p. 101. New York: Academic Press.
- Fraser, D. K. (1962). *Virology*, **17**, 397.
- Horowitz, E. B. & Novick, A. (1962). *Biochim. biophys. Acta*, **58**, 590.
- Jacob, F. (1954). *Les Bactéries Lysoogènes et la Notion de Provirus*. Paris: Masson.
- Jacob, F. (1955). *Virology*, **1**, 207.

- Jacob, F., Fuerst, C. R. & Wollman, E. L. (1957). *Ann. Inst. Pasteur*, **93**, 724.
- Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. & Wollman, E. (1953). *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 222.
- Jacob, F., Schaeffer, P. & Wollman, E. L. (1960). In *Microbial Genetics*, p. 67. London: Cambridge University Press.
- Jacob, F. & Wollman, E. L. (1954). *Ann. Inst. Pasteur*, **87**, 653.
- Jacob, F. & Wollman, E. L. (1956a). *Ann. Inst. Pasteur*, **90**, 282.
- Jacob, F. & Wollman, E. L. (1956b). *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 486.
- Jacob, F. & Wollman, E. L. (1957). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **245**, 1840.
- Jordan, E., Yarmolinsky, M. B. & Kalekar, H. M. (1962). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **48**, 32.
- Kaiser, A. D. (1957). *Virology*, **3**, 42.
- Kaiser, A. D. & Jacob, F. (1957). *Virology*, **4**, 509.
- Konetzka, W. A. & Berrah, G. (1962). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 407.
- Lederberg, E. M. & Lederberg, J. (1953). *Genetics*, **38**, 51.
- Lorfe, M. L., Lederberg, E. M. & Lederberg, J. (1956a). *Genetics*, **41**, 142.
- Lorfe, M. L., Lederberg, E. M. & Lederberg, J. (1956b). *Genetics*, **41**, 758.
- Level, H. R. & Luria, S. E. (1961). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **47**, 1968.
- Level, H. R., Luria, S. E. & Rotman, B. (1961). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **47**, 1956.
- Level, H. R., Luria, S. E. & Young, N. L. (1961). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **47**, 1974.
- Leiberts, C. F. (1963). *J. Gen. Microbiol.* **31**, 1.
- Siminovitch, L. & Jacob, F. (1952). *Ann. Inst. Pasteur*, **83**, 745.
- Starlinger, P. (1963). *J. Mol. Biol.* **6**, 128.
- Wollman, E. L. & Lederberg, J. (1947). *J. Bact.* **53**, 673.
- Wollman, E. L. (1953). *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 281.
- Yarmolinsky, M. B. (1963). *17th ann. Symp. Fund. Canc. Res.*, M. G. Anderson Hospital, Houston, Texas, U.S.A. Sous presse.
- Yarmolinsky, M. B., Jordan, E. & Wiesmayer, H. (1961). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 217.
- Yarmolinsky, M. B. & Wiesmayer, H. (1960). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **45**, 1786.

DEUXIÈME THÈSE



Propositions données par la Faculté

" La replication de l'ADN "

Vu et approuvé :

Paris, le 4 Juin 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MARC ZAMANSKY.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

JEAN ROCHE.

